

5028

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

N-NİTROZODİETİLAMİN VE KARARLI METABOLİTİ OLAN ASETALDEHİT'İN
PİRUVAT KİNAZ VE GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİYLE
İN VİTRO ETKİLEŞİMİ

DOKTORA TEZİ

Sevtap BAKIR

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: Prof.Dr.Atilla ATALAY

SİVAS-1988

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 5.1.1984 tarih ve 84/1 numaralı kararıyla kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Tüm lisans üstü eğitimim boyunca bilgisini ve tecrübesini hiç esirgemeyen, bu tezin hazırlanmasında da büyük katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof.Dr.Atilla ATALAY'a ve bilimsel açıdan pekçok yardımını gördüğüm Sayın hocam Yrd.Doç.Dr.Ahmet AKER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I-GİRİŞ ve AMAÇ	1
II-GENEL BİLGİLER	3
1.N-NİTROZODİETİLAMİN	3
2.ÇALIŞILAN ENZİMLER	10
A.Piruvat Kinaz	10
B.Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	12
III-GEREÇ ve YÖNTEM	15
1.GEREÇLER	15
2.YÖNTEMLER	15
A-N-NİTROZODİETİLAMİN'İN Sözü Edilen Enzimlere Etkisi- nin İn Vitro İncelenmesi	15
a-Piruvat Kinaz	15
b-Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	17
B-N-NİTROZODİETİLAMİN'İN Metabolizma Çalışması	20
C-N-NİTROZODİETİLAMİN ve Metabolitlerinin Enzimlere Bağ- lanıp Bağlanmadığının Diyaliz ve Poliakrilamid Jel Elektroforeziyle İncelenmesi	23
IV-BULGULAR	24
V-TARTIŞMA ve SONUÇ	48
VI-ÖZET	55
VII-SUMMARY	57
VIII-KAYNAKLAR	59

METİNDE YER ALAN ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1:N-Nitrozodietilamin'in metabolizması	4
Şekil 2:N-Nitrozodietilamin'in piruvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi	24
Şekil 3:Asetaldehitin piruvaz kinaz aktivitesine etkisi .	25
Şekil 4:Piruvat kinazın N-Nitrozodietilamin ile inhibis- yonunda sığır serum albumini'nin koruyucu etkisi.	26
Şekil 5:Piruvat kinazın N-Nitrozodietilamin ile inhibis- yonunda ADP'nin koruyucu etkisi	27
Şekil 6:Tavşan kası piruvat kinazının Fosfoenolpiruvata ilgisinin Hanes-Woolf grafikleme yöntemiyle gös- terilmesi	28
Şekil 7:İnkübe edilmiş piruvat kinaz ve N-Nitrozodietila- minin diyalizden önceki absorpsiyon grafiği.....	29
Şekil 8:N-Nitrozodietilamin ile inkübe edilmiş enzimin diyaliz sonrası absorpsiyon grafiği.....	30
Şekil 9:Diyaliz edilmiş piruvat kinaz N-Nitrozodietilamin karışımının ve diyaliz sıvılarının absorbans gra- fiği	31
Şekil 10:N-Nitrozodietilamin'in G6PDH aktivitesi üzerine etkisi.....	32
Şekil 11:Asetaldehitin G6PDH aktivitesi üzerine etkisi....	33
Şekil 12:G6PDH'ın N-Nitrozodietilamin ile inhibisyonunda sığır serum albumini'nin koruyucu etkisi.....	34

Sayfa

Şekil 13:G6PDH'ın N-Nitrozodietilamin ile inhibisyonunda NADP'nin koruyucu etkisi.....	35
Şekil 14:N-Nitrozodietilamin'in inhibisyonunda substrat de- rişiminin etkisi	36
Şekil 15:G6PDH'ın N-Nitrozodietilamin ile inhibisyonunda Lineweaver-Burk grafiği.....	37
Şekil 16:Glukoz-6-fosfat dehidrogenazının değişik substrat derişimlerindeki verilerinin Eisenthal-Cornish- Bowden direkt lineer grafiğiyle gösterilmesi....	38
Şekil 17:Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz-4,3 mM N-Nitrozodie- tilamin'in Eisenthal-Cornish-Bowden direkt lineer grafiği.....	39
Şekil 18:Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz-5 mM N-Nitrozodietil- amin'in Eisenthal-Cornish-Bowden direkt lineer grafiği.....	40
Şekil 19:İnkübe edilmiş enzim ve inhibitör karışımının di- yalizden önceki absorpsiyon grafiği.....	41
Şekil 20:N-Nitrozodietilamin ile bağlanmış enzimin absorb- siyon grafiği	42
Şekil 21:Diyaliz edilmiş Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz+N- Nitrozodietilamin karışımının ve diyaliz sıvılarının absorbans grafiği.....	43
Şekil 22:N-Nitrozodietilamin ile bağlanmış Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ın genişletilmiş absorpsiyon grafiği	44

Sayfa

Şekil 23:Enzim,N-Nitrozodietilamin+Enzim karışımının poli- akrilamit jel elektroforezindeki hareketliliği...	45
Şekil 24:Asetaldehitin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi grafığı.....	46
Şekil 25:Rat mikrozomuyla N-Nitrozodietilamin'in oksidatif dealkilasyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis—Men- ten grafikleriyle gösterilmesi	47



GİRİŞ ve AMAÇ

Birçok nitrozamin bileşiği, çevre kirleticisi olarak doğada yaygındır. Nitrozaminler karsinogenik ve mutajenik bileşiklerdir ve vücutta bazı tersiyer amin yapılı bileşiklerin nitritle etkileşiminden oluştuğları saptanmıştır (1,2).

Bir nitrozamin bileşiği olan N-Nitrozodietilamin (DNA) ile başlatılmış kanserleşme sırasında DNA polimeraz enzimlerinde ardışık dizi değişiklikleri oluştuğu saptanmıştır (3). Öte yandan DNA'nın karaciğer ve akciğerde protein ve RNA sentezini inhibe ettiği bulunmuştur (4). DNA uygulanması sonucu rat hepatositlerinde mitotik aktivitenin çok düştüğu ve çekirdek hacminin arttığı görülmüştür (5). Gerçekten DNA uygulanan hayvanlarda belli bir süre sonra hepatosellüler tümörler ve karaciğerde enzim eksikliği olan odaklar saptanmıştır (6).

Yukarıda anlatıldığı gibi, pek çok zararlı etkisi olan DNA, yaşamımızla içiçedir. Bu yüzden nitrozolu bileşiklerin zararlarının ve etki mekanizmasının tam

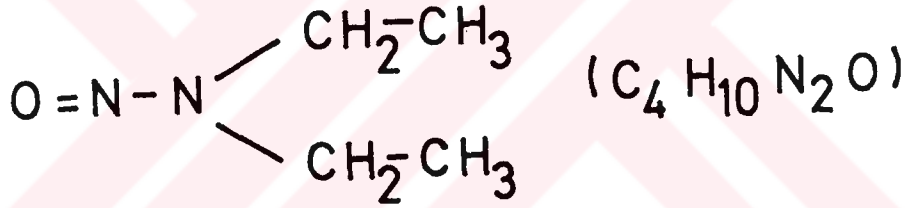
olarak öğrenilmesi, canlı sağlığını korumak açısından önemlidir. Başka bir deyişle nitrozolu bileşiklerin etkisi bilinirse zararlarına karşı önlem alınması kolaylaşır. Bu çalışmada, bir çok zararlı etkisi saptanmış olan DENA'nın, metabolik yollardaki kilit enzimlere etkisinin araştırılması ve metabolizmasının incelenmesi amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

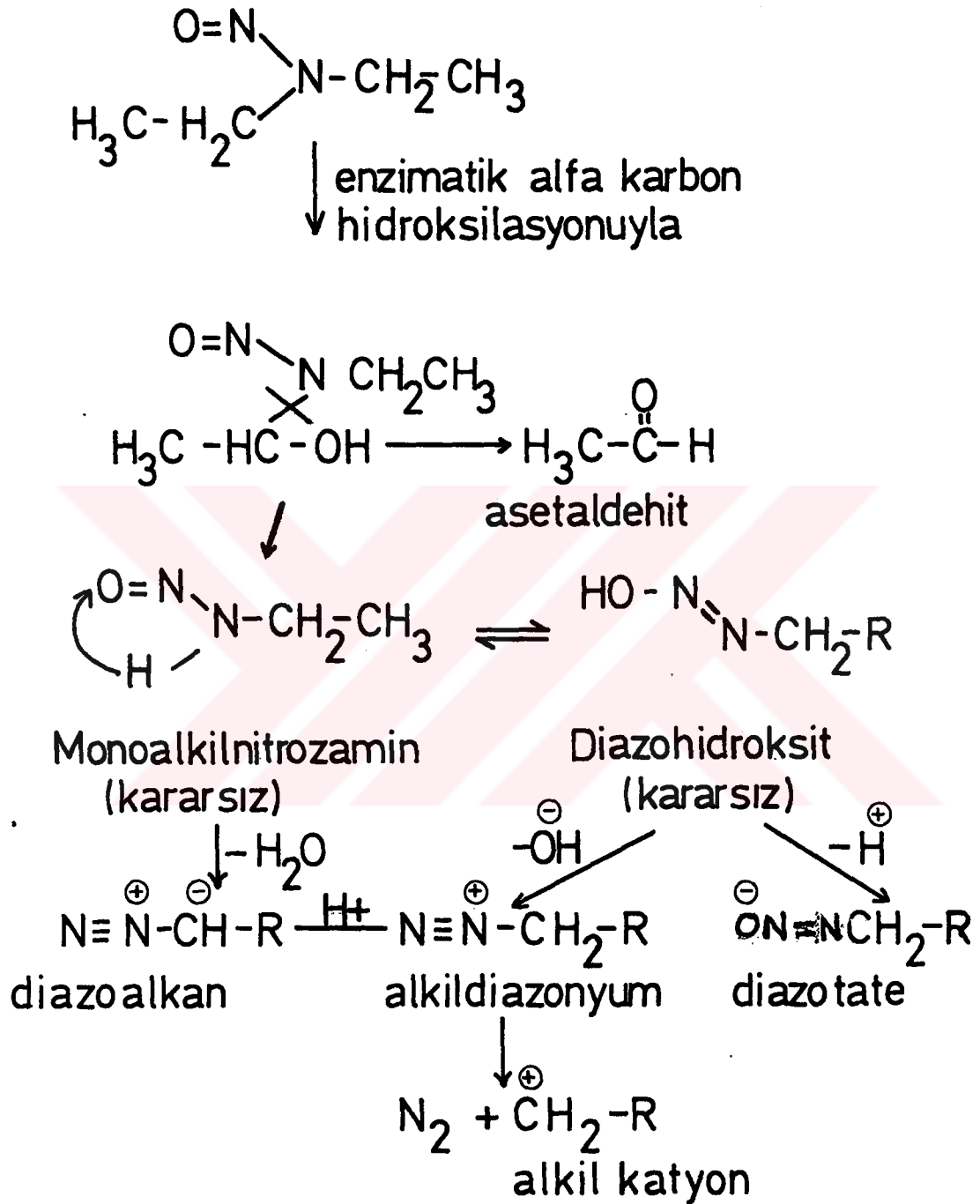
1-N-NİTROZODİETİLAMİN'İN GENEL ÖZELLİKLERİ

DENA'nın molekül ağırlığı 102,12, kaynama noktası 176,9, yoğunluğu 0,942'dir. Sarı bir sıvı olan DENA, suda ve çeşitli organik çözücülerde çözünür. Aşağıdaki kimyasal formüle sahiptir (7).



N-Nitrozodimetilamin (DMN) ile ilk denemeleri 1956 da Dutton ve Health yapmışlar ve DMN'nin başlıca karaciğerde enzimatik olarak demetilize olduğunu göstermişlerdir. Genelde dialkil nitrozaminlerin yıkım yolları aynıdır (Şekil 1), (8).

Hayvan ve insanlarda kanser oluşumu çok adımlı bir işlemdir. İlk adım, kimyasal kanserojen ve prekanserоjenin metabolik enzimlerle aktivasyonunu içerir. Oluşan elektrofilik reaktantlar hücresele nükleofillerle birleşirler (9).



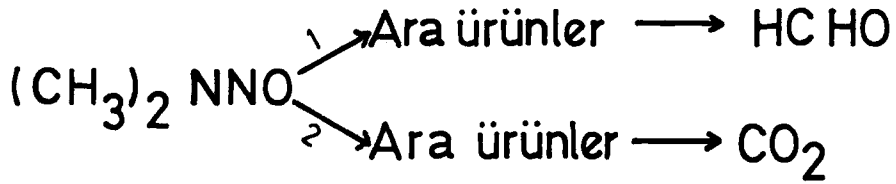
Şekil 1: N-Nitrosodietilaminin Metabolizması

Dialkilnitrozaminlerin in vivo ana metabolik yolu, sitokrom P-450 ye bağlı karaciğer mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz sistemiyledir. Bu yolla oksidatif dealkilasyon ara ürünleri oluşur. DENA, mikrozom ve NADPH yenileyen sistemle inkübe edildiğinde asetaldehit ve etanol oluşumu, gaz-sıvı kromatografisiyle gösterilmiştir (10).

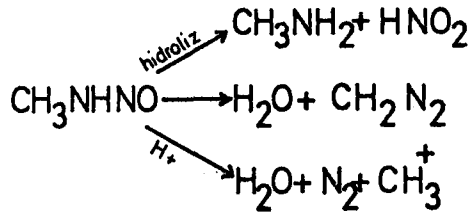
Nitrozaminler, alkilleme yoluyla nükleik asitler ve proteinlerle reaksiyon verirler. Metabolik yollardaki bu olaylar, radyoaktif maddelerle izlenir. Metabolik yoldaki, alkillenme özelliği başlangıçta alfa hidrosilasyonuyla bir aldehit oluşumu ile başlar. Daha sonra da alkildiazohidroksit, alkildiazonyum katyonu ve karbonyum iyonu oluşur. Azot-15 ile işaretli nitrozaminler ratlara verildiğinde idrar üresinde, karaciğer proteinlerinde ve nükleik asitlerde, radyoaktif maddeler saptanmıştır (11).

Kimyasal kanserojen DMN ve DENA'dan mutajenik metabolitlerin oluşması, Salmonella typhimurium G-46 kullanılarak ölçülebilir. Aslında DMN ve DENA'nın kendileri mutajen değildir, memeli enzim sistemleriyle mutajenitesi yüksek bileşiklere çevrilirler. Mutajen olan DMN'nin metabolizmasında hız belirleyen basamak, mikrozomal enzim sistemleriyle oluşan N-demetilasyondur (12).

DENA enjeksiyonundan sonra yirmidört saat idrar toplanmış ve idrarda, verilen doz yüzdesine göre artan miktarda DENA'ya raslanmıştır. Ayrıca, nitrozaminlerin salınan havaya atılım hızı hesaplanmıştır. DMN ve DENA ratlarda tamamiyle bozunur.



Birinci reaksiyon, ana oksidasyon basamağıdır. Çok kararsız ara ürünler oluşur. Ara ürünler çok düşük derişimdedir. Ana oksidasyonun mümkün ürünleri aşağıda görülmektedir.



Bütün bu eşitliklerin sonucunda ana oksidasyon basamağının ve yan reaksiyonların toksik ürünler verdiği, dolayısıyla dialkilnitrozaminlerin toksik olduğu anlaşılır (13).

DMN ve DENA'nın, özel mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidazlar tarafından N-dealkilasyonu sonucu mutajenite, karsinojenite ve toksisiteden sorumlu olan alkilleyici ara ürünler oluşur (14). DMN ve DENA aktivasyonu, mikrozomlara, oksijene ve NADPH bağımlı sitokrom P-450 sistemine ihtiyaç duyar. DMN'nin oksidatif demetilasyon hızı formaldehit oluşumunun ölçülmesiyle tayin edilir (15). DMN alkilleme aktivitesi, indükleyici uygulanan hayvanların mikrozomlarıyla in vitro olarak ölçülür. Alkilleme gücünün değişikliği, promutajen derişimine, indükleyiciye ve kullanılan hayvan türüne bağlıdır (16).

DMN ve DENA uygulanmasıyla zamana ve doza bağımlı olarak protein sentezi inhibe edilir. DENA'nın protein sentezini inhibisyonu DMN'den beş kez güçlüdür. Zaman ve DENA derişimi arttıkça protein sentezi azalır (17).

DENA'nın yüksek dozları verildiğinde kardeş kromozomlarda önemsiz değişiklikler görülür. DENA, in vivo olarak kromozomal seviyelerde inaktif, moleküler seviyede aktiftir. İn vitro olarak, mikroorganizmalarda kromozomal ve moleküler seviyelerde kuvvetli aktiftir (18). DENA'nın insan lenfosit kromozomlarına etkisi incelenmiş olup düşük derişimlerinde poliploidi, halka kromozom ve kromozom kırıkları oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca

düşük derişimlerde mitotik indeksi yükselttiği halde, yüksek derişimlerde sifıra kadar düşürdüğü bulunmuştur (19).

Kauçuğun vulkanizasyonunda ve tekstil ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan nitrozaminlerin, ratlarda yüksek kanserojenik etkisi saptanmıştır. DENA verildiğinde ratlarda hepatosellüler karsinoma ve böbrek tümörü görülür (20).

DENA'nın tekli oral intraperitoneal ve intravenöz uygulanmasıyla karaciğer kanseri oluşur. 100 mg/kg DENA uygulanmasından 24 saat sonra nekrotik hepatositler oluşmaya başlar. Oluşum zamanla artar (21).

DMN uygulandıktan sonra böbrek ve karaciğer nükleik asit hidrolizatında metillenmiş bazlar sadece adenin ve guanindir. DMN'nin yıkılmasıyla aktif metabolitlerin oluşması 24 saatte biter (22). DENA, diğer hücre bileşenlerinin yanı sıra DNA ve RNA daki guanin molekülleri- ni alkiler. ³H-DENA'nın farelere ³H-³H-DENA'nın farelere tek dozda verilmesinden on gün sonra karaciğer, böbrek, dalak ve barsaktaki bağlı ³H aktivitesi oranları sırayla 100:74:40:17 olarak bulunmuştur. Bu sonuç da, DENA'nın kanserojen etkisinin organlara spesifik olduğunu göstermektedir (23).

DENA uygulanması boyunca kobayda, karaciğer endoplazmik retikulumda ince yapı değişiklikleri görülür.

DENA ile oluşturulan hepatik tümör hücrelerinde granüllü endoplazmik retikulumda fazlaca çoğalma, düz endoplazmik retikulumda daha az çoğalma görülür. Granüllü endoplazmik retikulumun dış yüzeyindeki ribozomlar ise seyrekleşir. DENA için LD₅₀ guine-pig de 692+46 mg/kg dır. DENA verilmesiyle kobay karaciğerinde oluşan ince yapı değişiklikleri şunlardır; mitokondri yapısında çeşitli varyasyonlar gözlenir. Glikojen çeşitli tümör hücrelerinde yoktur veya seyrekdir. Golgi kompleksi iyi gelişmiştir. Total mikrozomal RNA azalır (24).

Farelere DENA ve fenobarbital (promotör) birlikte verildiğinde karaciğerde enzim farklılığı olan odaklar oluşur. Odaklarla tümörler arasında ilişki histokimyasal işaretleyicilerle belirlenebilir. En yaygın kullanılanlar, gama glutamil transpeptidaz ve ATP'az dır (25). Karaciğerde enzim farklılığı olan odakların artması, hepatokarsinogenezin genel bir sonucu olabilir. Başlangıç aşamalarından sonra çeşitli biyokimyasal değişikliklerin olduğu ileri sürülmektedir (26).

DENA uygulanan farelerde 5-15 hafta sonra yüksek oranda safra kesesi hiperplazisi oluşur (27). DENA ile nikotinamid birlikte verildiğinde böbrek tümörü gelişir. Sadece nikotinamid verildiğinde ise böbrek tümörü oluşmaz (28). Oral olarak DENA uygulandığında

hepatik karsinomalar ve çeşitli tümörler oluşur. Tümör lenf ve kan damarlarını kaplar. Akciğer ve böbrekte metastaz yapar (29).

DENA verilen farelerde birkaç hafta sonra DNA replikasyonunda artma olduğu halde daha sonra normal değerlere düştüğü görülür. Hayvanların karaciğerlerinde kanser oluşumu sırasında polimeraz alfa aktivitesinde hızlı bir artış olurken polimeraz beta aktivitesinde yavaş bir artış gözlenir. Yani replikasyon çok fazla olduğu halde tamir yavaştır (3).

DENA'dan oluşan reaktif metabolit tarafından O^6 -etilguanin oluşumu doza bağımlıdır. 7-etilguanin oluşumu O^6 -etilguanin oluşumundan fazladır. DNA'nın alkilenmesi 7-etilguanin oluşumuyla ölçülür (30).

Yukarıda anlatıldığı gibi, birçok zararı bulunan DENA'ya çeşitli yiyeceklerde (31) ve sigara içenlerin tükürük salgılarında rastlanmıştır (32).

2-İNCELENEN ENZİMLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

A-Piruvat Kinaz

Piruvat kinaz (ATP 2.0.fosfotransferaz;E.C.2;7.1.40) ilk kez rat kasından Negeleir tarafından 1942 de saflaştırılmıştır. Bir glikolitik enzim olan piruvat kinaz, sitoplazmada bulunur. Karaciğer, böbrek, kalp, iskelet kası ve beyinde saptanmıştır. Bu organlardaki

piruvat kinaz elektroforezde tek band verir. Eritrositlerde piruvat kinaz eksikliğinde siferositik olmayan hemolitik anemi oluşur. Hastalık otozomal resesiftir.

Piruvat kinaz aktivitesi laktat dehidrogenaz (LDH)'nın, NAD oluşturduğu reaksiyonla birleştirilerek okunur. Direkt olarak PEP'in azalmasına görede tayin edilebilir (33). Piruvat kinazın katalizlediği tepkime şudur.



Bu glikolizdeki son tepkimedir (34).

Denge, PEP'ten fosfat grubunun ADP ye aktarılması yönündedir (35). Tepkime ekzergoniktir. Hücre içi şartlarda tersinmezdir. Magnezyum veya mangana ihtiyacı vardır. Potasyumun enzime bağlanıp onu konformasyonel değişikliğe uğrattığı ve aktif hale soktuğu söylenir. Piruvat kinaz memelilerde düzenleyici enzimdir ve çeşitli dokularda farklı şekilde bulunur. Karaciğer tipi Fruktoz 1-6 difosfat ve fosfoenolpiruvat (PEP)'in yüksek derişimleriyle aktive olup ATP, AMP, sitrat ve alaninle inhibe edilir. Karaciğer glikolizinde insülin, piruvat kinaz aktivitesini artırır (36).

Büyük bir protein olan piruvat kinaz üç yapısal şekilde organize edilmiştir. Birincisi beta kırmalı, ikincisi beta düzensiz yapı, üçüncüsüde antiparelel

beta kırmalı tabakadır (37).

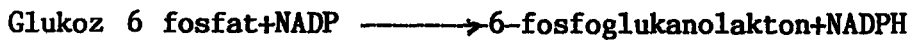
Piruvat kinaz, tetramerik bir yapıya sahiptir. Herbir monomerik ünitenin molekül ağırlığı 57 bindir. Piruvat kinazın molekül ağırlığı 237 bindir. İzoelektrik pH sı 7.5 tur. ADP, GDP, IDP, UDP ve CDP yi kataliz için koenzim olarak kullanabilir. Piruvat kinazın özgül doğal substratı PEP'tir (38).

Ratlardan iki tip piruvat kinaz saflaştırılmış, özellikleri çalışılmıştır. Enzim aktivitesinin hücre farklılıklarına, diyet ve hormonlara bağımlı olduğu görülür (39).

Piruvat kinaz CM-sefadeks kromatografisiyle saflaştırılabilir (40). İnsan alyuvar piruvat kinazının, dietilpirokarbonat ile modifikasyonu çalışılmıştır (41). Ayrıca protein derişimi ve pH nın insan alyuvar piruvat kinazına etkisi incelenmiştir (42).

B-Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PDH)

G6PDH (E.C.1.1.1.49), ilk önce eritrositlerden elde edilmiştir. Daha sonra bütün hayvan dokularından ve mikroorganizmalardan izole edilmiştir. Kan hücreleri, adipoz doku ve laktasyon dokuları, enzimin zengin kaynağıdır. Enzimin katalizlediğı tepkime şudur:



NADPH'ın oluşma hızı enzimin aktivitesi olarak ölçülür (33). G6PDH, biyosentez yolları için NADPH oluşturan en önemli enzimdir (37).

Tiroksin enjeksiyonuyla G6PDH aktivitesi artar. Bu artış, enzim proteini sentezindeki aminoasit t-RNA'nın transferini hızlandırmak suretiyle olur (43). Fare meme bezi G6PDH'ı iki alt birim içerir. Katalizlediği reaksiyon, sülfonamidler ve kinakrin gibi bazı ilaçlarla inhibe edilir (44).

G6PDH eksikliği, primakine duyarlılık veya favizm olarak bilinen kalıtsal hastalıkta görülür. Pentoz fosfat yolunun bu enzimi alyuvarlarda eksiktir. Nedeni bu enzimi sentezleyen genin değişikliğe uğramasıdır. Sentezlenen enzim dayanıksızdır. Hücreler içinde parçalanır. Katalitik özelliği açısından değişmemiştir. G6PDH eksikliği NADPH eksikliğine yol açar. Bunun sonucunda indirgenmiş glutatyon derişiminin az olmasıyla anemi oluşur. Alyuvarların dayanıklılığı için indirgenmiş glutatyona ihtiyaç vardır. Ayrıca, G6PDH eksikliğinde NADPH düzeyi azalmış olduğundan karaciğerde NADPH ile yürütülen zehirsizleştirme tepkimeleri engellenir (36).

L.mesenteroides'ten izole edilen G6PDH'ın molekül ağırlığı 102.000 dir. Candıda utilisten izole edilen

G6PDH'ın NADP için Km değeri 0.067 mM olarak bulunmuştur. Enzimatik aktivite kompetitif olarak pridoksal-5-fosfat ve çeşitli nükleotidlerle inhibe edilir (45).

G6PDH'a zwischen ferment de denir. Çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir (46). Bütün deney sonuçlarına bakıldığı zaman G6PDH aktivitesinin, alınan besin, hormonal denge ve $\text{NADP}^+/\text{NADPH}+\text{H}^+$ oranına bağlı olarak düzenlendiği anlaşılmaktadır (47).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

I-GEREÇLER

a-Bu çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler Cumhuriyet Üniversitesinden sağlandı.

b-Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma ve Merck firmalarından sağlandı. Piruvat Kinaz (tip III, Tavşan kası enzimi, liyo-filize) ve Glukoz-6-Fosfat dehidrogenaz (tip V, maya enzimi, liyo-filize) Sigma firmasından sağlandı.

II-YÖNTEMLER

A-DENA'nın Sözü Edilen Enzimlere Etkisinin İn Vitro İncelenmesi

a-Piruvat kinaz aktivite tayini

I-Deneyin prensibi

Piruvat kinaz aktivite tayininde kullanılan yöntem iki enzimli ve iki kademelidir. Birinci kademede Fosfoenolpiruvattan piruvat oluşur. İkinci kademede ise piruvattan NADH kullanılarak laktat oluşur. Ortamda bulunan NADH'in absorbansının azalışı 340 nm de gözlen-di. Sonuçlar mg protein başına bir dakikada oluşan µmol ürün olarak verildi.

II-Çözeltiler

-Trietanolamin (TEA) tamponu: 0,1 M, pH 7,6

-Mağnezyum sülfat-Potasyum klorür: 50 mM

MgSO₄/0,2 M KCL

-Fosfoenolpiruvat (PEP): 105 mM (MgSO₄/KCL içinde)

-ADP çözeltisi : 94 mM

-NADH çözeltisi : 12 mM

-LDH süspansiyonu : 5 mg/ml, 450 U/mg

-Piruvat kinaz süspansiyonu: 540 U/mg protein, tavşan kası enzimi, tip III, liyofilize

-Sığır serum albümini (BSA) çözeltisi : 6,6 µg/ml, 13 µg/ml, 33 µg/ml

-ADP çözeltisi : 0,26 mM, 0,13 mM

III-Deney karışımı ve uygulama

TEA tamponu : 2,62 ml

PEP çözeltisi : 0,15 ml

ADP çözeltisi : 0,15 ml

NADH çözeltisi : 0,05 ml

LDH süspansiyonu : 0,01 ml

Piruvat kinaz süspansiyonu : 0,02 ml

Köre 3 ml TEA tamponu, numune kuvetine ise deney karışımı konuldu. Alet içinde beş dakika 30°C de ısıtıldı ve 0,02 ml piruvat kinaz eklendi. 340 nanometrede (nm) tepkime dört dakika izlenerek başlangıç hızının

doğrusal kısımdan ΔA bulundu. Absorbans değişimini okumak için Beckman Model 26 kaydedici ve elektronik ısı kontrollü spektrofotometre kullanıldı.

IV-Aktivitenin hesaplanması

$$\text{Hacim aktivite: } \frac{3.00}{6,22 \times 1,0 \times 0,02} \Delta A/\text{dak} = \text{U/ml Enzim}$$

$$\text{Spesifik aktivite: } \frac{\text{Hacim aktivite}}{\text{Enzim derişimi mg/ml}} \text{U/mg protein}$$

V-İnhibisyon çalışmaları

a-0,27 mM, 0,4 mM, 0,53 mM ve 0,6 mM DENA, piruvat kinaz ile eşit hacimlerde karıştırıldı.

b-26 mM, 33 mM, 60 mM asetaldehit, piruvat kinaz ile eşit hacimlerde konuldu.

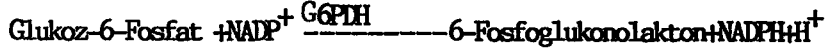
Yukarıdaki karışımlar 30°C de inkübe edildi. 5,10, ve 20 dakika sonra enzim kaynağı olarak kullanılarak aktivite tayini yapıldı.

VI-İnhibisyonun önlenmesi çalışmaları

Bu çalışmada piruvat kinaz, 0,6 mM DENA ve değişik derişimlerde BSA veya ADP ile eşit oranlarda karıştırıldı. 30°C de inkübe edildi. Enzim kaynağı olarak kullanılıp 5,10 ve 20 dakikalarda aktivite tayin edildi. Absorbans değişimi dört dakika boyunca gözlemlendi.

b-Glukoz-6-Fosfat dehidrogenaz aktivite tayini

I-Deneyin prensibi



Bu yöntem, Glukoz-6-fosfatın oksitlenmesi sırasında, indirgenen NADP'nın artan absorbansınının 340 nm de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

II-Çözeltiler

-TEA tamponu : 0,1 M, pH 7,6

-MgCl₂ çözeltisi : 0,1 M

-Glukoz 6 fosfat çözeltisi : 35 mM

-NADP çözeltisi : 11 mM

-G6PDH süspansiyonu : 140 U/mg, 0,00125 mg protein/3 ml, maya enzimi, tip V, liyofilize

-BSA çözeltisi : 6,6 µgm/ml, 13 µgm/ml, 33 µgm/ml

-NADP çözeltisi : 0,32 mM, 0,18 mM

III-Deney karışımı

TEA tamponu : 2,59 ml

MgCl₂ çözeltisi: 0,2 ml

Glukoz 6 fosfat çözeltisi : 0,1 ml

NADP çözeltisi : 0,1 ml

Kör tüpüne 3 ml TEA tamponu konuldu. Deney karışımı hazırlandıktan sonra 30°C ye ayarlanmış küvet tutucu içinde beş dakika ısıtıldıktan sonra 0,02 ml enzim otomatik pipetle ilave edilerek tepkime başlatıldı ve 5 dakika süre ile 340 nm deki absorbans değişimi

ölçüldü. Başlangıç hızının doğrusal kısmından ΔA (dakika-
kadaki absorban değişimi) bulunarak aşağıdaki eşitlik-
ten enzim aktivitesi hesaplandı.

$$\text{Hacim aktivite: } \frac{3,00}{\epsilon \times l \times 0,02} \times \Delta A / \text{dak} = \text{Ünite/ml Enzim}$$

$$\epsilon_{340} = 6,22 \text{ umol/cm}^2$$

$$\text{Spesifik aktivite: } \frac{\text{Hacim aktivite}}{\text{Enzim derişimi mg/ml}} = \text{U/mg protein (48)}$$

IV-İnhibisyon çalışmaları

a-4 mM, 4,3 mM, 4,7 mM ve 5 mM DENA, G6PDH ile eşit hacimlerde karıştırıldı.

b-30 mM, 33 mM, 40 mM ve 47 mM asetaldehit G6PDH ile aynı miktarlarda konuldu.

Yukarıdaki karışımlar 30°C de inkübe edildi. 5,10 ve 20.dakikalarda enzim kaynağı olarak kullanılarak aktivite tayini yapıldı.

V-İnhibisyonun önlenmesi çalışmaları

Bu çalışmada enzim, 5 mM DENA ve değişik derişimlerdeki BSA veya NADP ile eşit oranlarda karıştırıldı. 30°C de inkübe edildi. 5,10 ve 20. dakikalarda bu karışım enzim kaynağı olarak kullanılarak aktivite tayini yapıldı (48).

Enzim aktivitesi ölçümlerinde Beckman Model

26 elektronik ısı kontrollü ve kaydedicili spektrofotometre kullanıldı.

B-DENA'nın Metabolizma Çalışması

1-Mikrozom eldesi

150 mg/kg fenobarbital uygulanan ratlar dört gün sonra öldürüldü. Karaciğer tartılıp, ağırlığının 3 katı kadar 0,15M KCl tamponu kondu. Beş vuruşta B. Braun homojenizatörüyle homojenize edildi. Beckman Model J2-21 santrifüjünde 11500 xg de 30 dakika santrifüjlendi. Dökelti alındı. Beckman Model L5-75 B ultrasantrifüjünde 105.000 xg de 60 dakika santrifüjlendi. Çökelti alındı. % 10 gliserol içeren 0,05 M pH 7,5 luk fosfat tamponuyla, 1 gr karaciğere 0,5 ml tampon olacak şekilde sulandırıldı. Mikrozom fraksiyonu olarak kullanıldı. Mikrozom fraksiyonunun ilaç metabolizması açısından aktif olup olmadığı, NADPH-Sitokrom C(P-450) redüktaz aktivitesi Pederson ve Ark.(49) yöntemiyle ölçülerek kontrol edildi.

2-DENA'nın metabolitlerinin tayini

Deney karışımı

2,9 ml fosfat tamponu, 0,1 M, pH 7,5

— 3 mg mikrozom proteini

— 3,5 mg semikarbazit HCl

— 0,7 mM NADP

— 7,4 mM Glukoz-6-P

— 20 mM MgCl₂

— 3 U G6PDH

Kör tüpüne deney karışımıyla beraber 0.1 ml fosfat tamponu kondu. Numunelere 0,0025 M, 0,025 M, 0,050 M, 0,1 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M, 0,8 M DENA kondu. Üzerlerine deney karışımı ilave edildi. 30 dakika 37°C de inkübe edildi. Reaksiyon 1 ml % 15 lik ZnSO₄ ve 1 ml doymuş Ba (OH)₂ ilavesiyle durduruldu. Santrifüjlenip, dökelti asetaldehit tayininde kullanıldı (50).

3-HPLC' (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) de asetaldehit tayini

0,012 mM'lik asetaldehit standardı ve 2,5 mM DENA dan oluşturduğumuz dökeltinin 1 ml sine 0,1 ml 2,4 Dinitrofenilhidrazin (DNFH) çözeltisinden (250 mg DNFH, 100 ml 6N HCL de çözülür) eklendi. 25°C de 30 dakika inkübe edildi. Buradan alınan 5 µl örnek 3 ml/dk akış hızıyla 2000 psi ve 1,0 Auf de Econasil C-18 kolonundan 15 dakika geçirildi. Çözücü olarak % 60'luk asetonitril-su kullanıldı. Absorbans tayini 254 nm de yapıldı (51).

4-Enzimatik olarak asetaldehit miktar tayini



Çözeltiler

-Potasyum difosfat K₄P₂O₇ tamponu : 0,3 M, pH 9

-NAD çözeltisi: 49 mM/lt

-HCl çözeltisi: 1 M

-Aldehit dehidrogenaz (ALDH) çözeltisi: 75 U/ml

-Asetaldehit çözeltisi: 3-20 µg asetaldehit/küvet

Yöntem

	Kör	Örnek	Standart
Tampon	1 ml	1 ml	1 ml
NAD	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Distile su	2 ml	1 ml	1 ml
Örnek	-	1 ml	-
Asetaldehit	-	-	1 ml

Karıştırıldı. 2-3 dakika sonra 340 nm de suya karşı okundu (A_1)

ALDH	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
------	---------	---------	---------

katıldı. Karıştırıldı. 3-4 dakika sonra 340 nm de suya karşı okundu (A_2)

$$A_B = A_2 - A_1 \quad \Delta A = \Delta A_S - \Delta A_B$$

$$c = \frac{A}{\epsilon} \times 1.374 \quad \frac{\text{gr asetaldehit}}{\text{Örnek çözelti}} \quad (52)$$

A_B : Körün absorbans değişimi ; $\epsilon_{340} = 6,3 \times 10^4 \text{ (l x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1})$

A_S : Numunenin absorbans değişimi

6-DENA ve Metabolitlerinin Enzimlere Bağlanıp Bağlanmadığının Diyaliz ve Poliakrilamit Jel Elektroforesiyle İncelenmesi

a-Diyaliz yöntemi

200 µgm enzimle, 500 µmol DENA 37°C inkübe edildi. İnkübasyon 30 dakika sürdü. İnkübasyondan sonra bağlanmamış DENA moleküllerini uzaklaştırmak için enzimin tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi tampon altı saatte bir değiştirilerek 18 saat sürdürüldü. Diyalizatın dalga boyuna karşı absorbansı grafiklenerek serbest enzim ve serbest DENA absorbans grafikleriyle karşılaştırıldı.

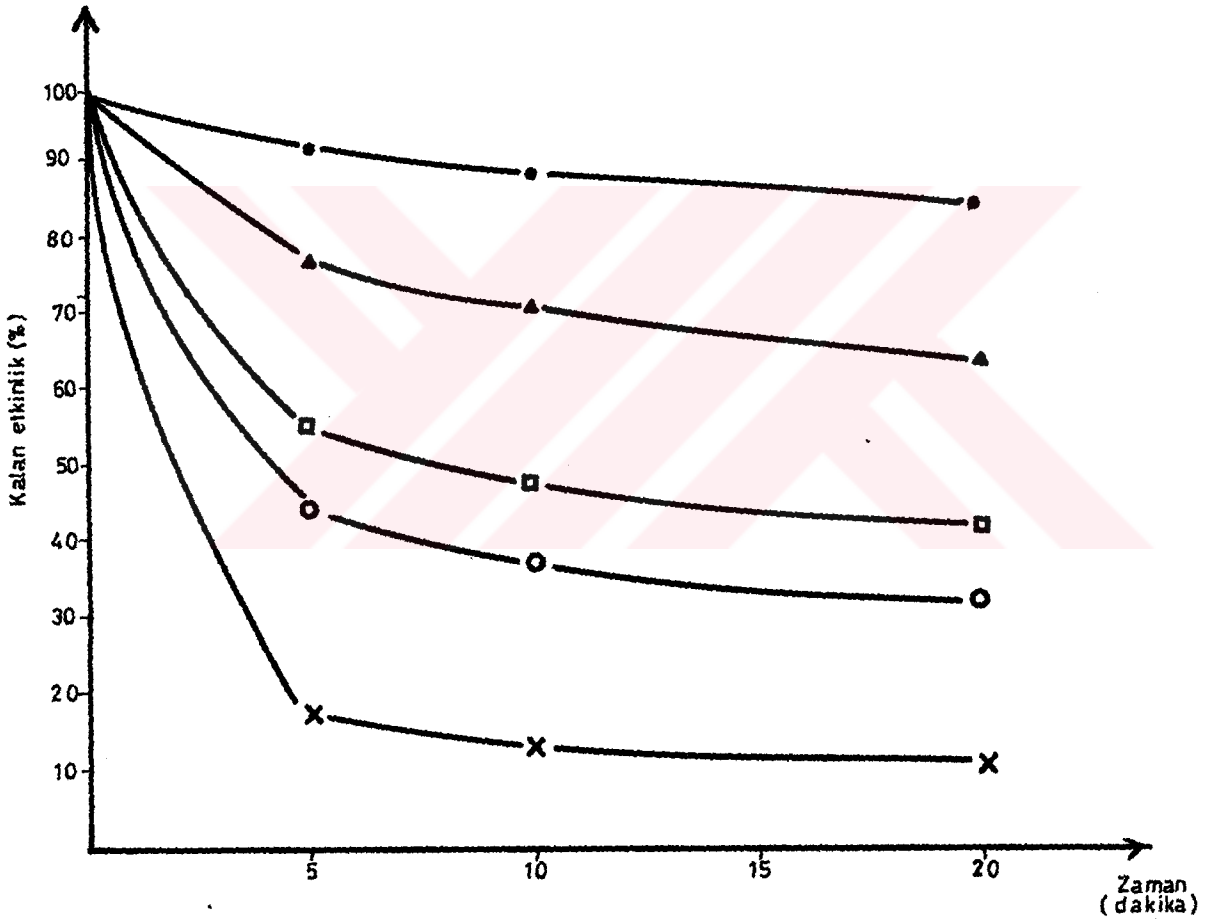
b-Poliakrilamit jel elektroforezi yöntemi

Bu amaçla 0,01 M, pH 7,1 lik fosfat tamponu içinde % 7,5 luk poliakrilamit jeli hazırlandı. 10 ul stok enzim, 10 µl 500 mM DENA ve 2-3 sükroz kristali içeren numune ile 10 µl stok enzim ve 2-3 sükroz kristali içeren numune 37°C de 30 dakika inkübe edildi. Jele beşer µl bu örneklerden uygulandı. Örnekler LKB 2117 Multiphor elektroforezinde 10 mA akımda, 500 votta 2 saat yürütüldü. Bu süre sonunda jel tesbit edildi. Coomassie-Brilliant blue boyası ile boyandı. Daha sonra boyanın fazlası 3/1 oranında Etanol Asetik asit karışımıyla uzaklaştırıldı. Jel 300 ml etanol, 100 ml Asetik asit, 100 ml Gliserol içeren bir çözeltide saklandı (53).

BULGULAR

a-PİRUVAT KİNAZ ENZİMİNE N-NİTROZODİETİLAMİN'İN ETKİSİ,
KİNETİK ÇALIŞMALAR VE BAĞLANMA DENEYLERİ,

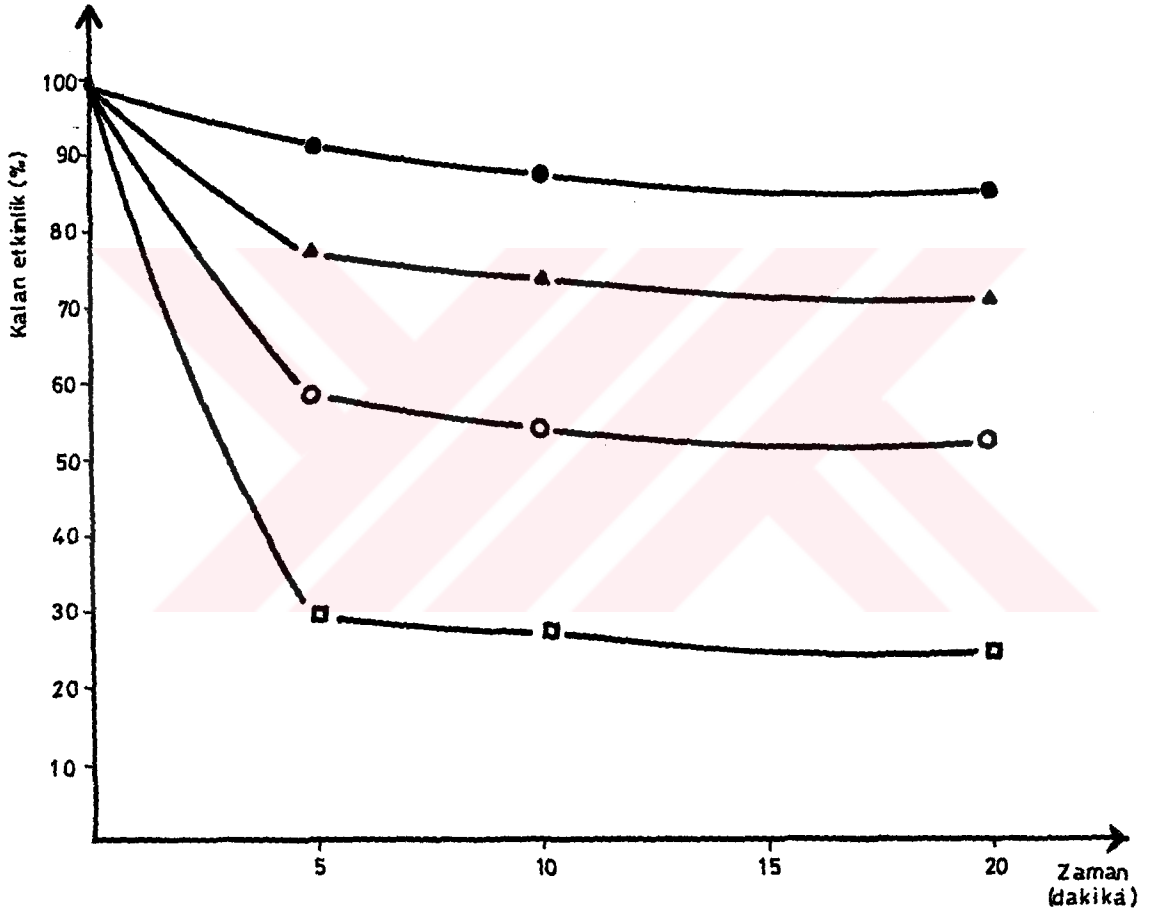
DENA'nın piruvat kinaz üzerine inhibitör etkisinin zamanla arttığı gözlemlendi. Ayrıca DENA derişimi arttıkça inhibisyon etkisi arttı. Piruvat kinazın % 50 sini inhibe eden DENA derişimi 0,38 mM olarak bulundu (Şekil 2).



Şekil 2: N-Nitrozodietilaminin piruvat kinaz aktivitesi üzerine etkisi

- Kontrol
- ▲—▲ 0,27 mM DENA; □—□ 0,40 mM DENA
- 0,53 mM DENA; ×—× 0,60 " "

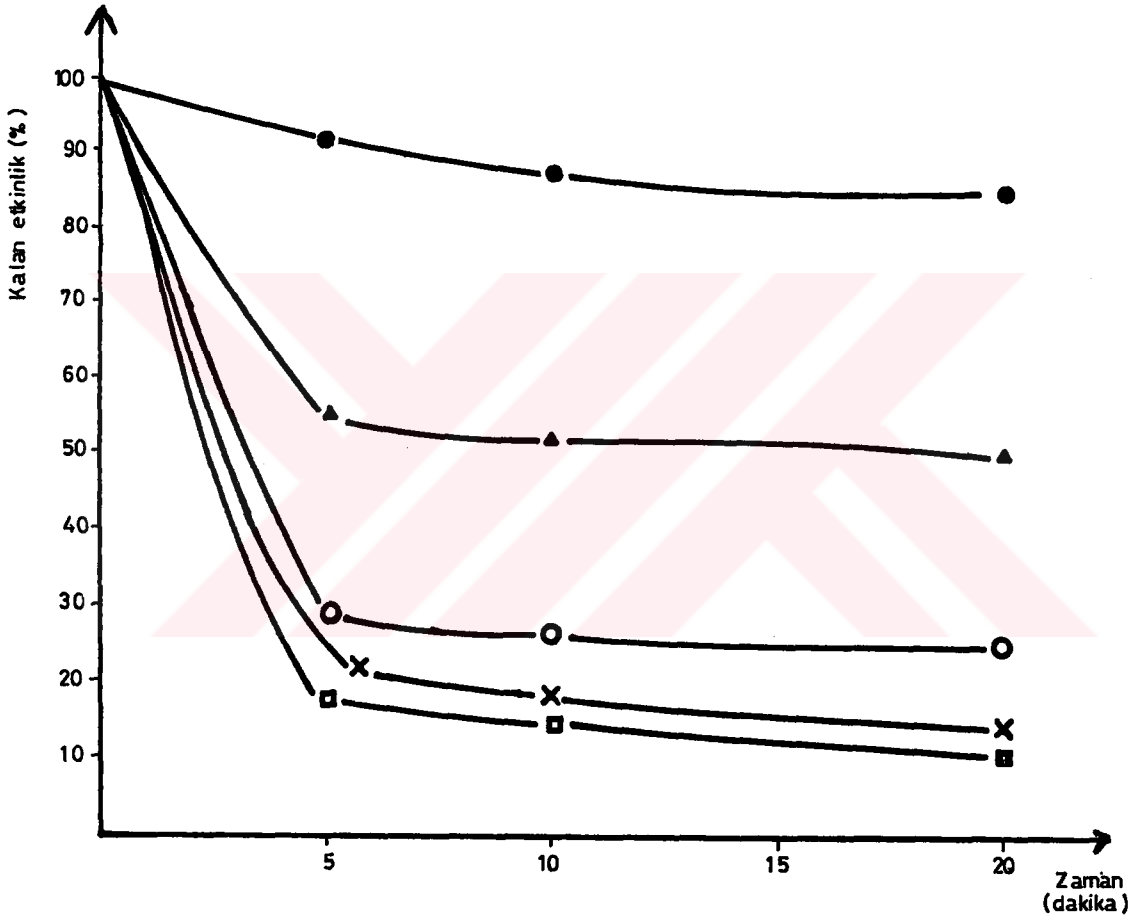
DENA'nın metaboliti olan asetaldehitin de piruvat kinazı inhibe ettiği gözlemlendi. İnhibitör etki zamanla ve asetaldehit derişiminin artmasıyla arttı. Piruvat kinazın % 50 sini inhibe eden asetaldehit derişimi 36 mM olarak bulundu (Şekil 3).



Şekil 3: Asetaldehitin piruvat kinaz aktivitesine etkisi

●—● Kontrol; ▲—▲ 26 mM Asetaldehit
○—○ 33 mM Asetaldehit; □—□ 60 mM Asetaldehit

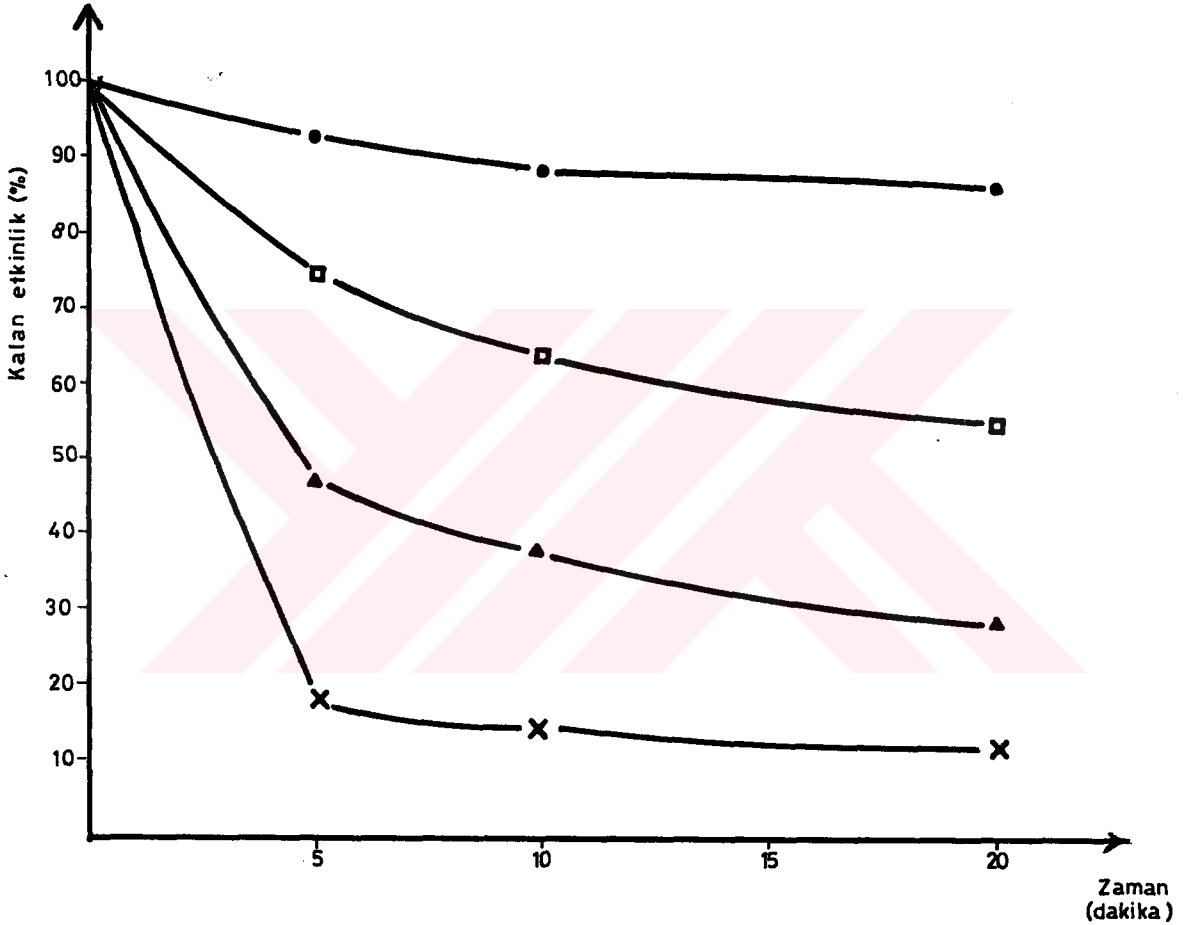
Piruvat kinazın DENA ile inhibisyonunda BSA'nın koruyucu etkisi çalışıldı. BSA derişimi arttıkça DENA'nın inhibisyon etkisinin azaldığı gözlendi. BSA'nın koruyucu etkisinin zamanla arttığı görüldü (Şekil 4).



Şekil 4: Piruvat kinazın N-Nitrozodietilamin tarafından inhibisyonunda sığır serum albümini'nin koruyucu etkisi

- Kontrol; 0,6 mM DENA
- ▲—▲ 33 µg/ml deney karışımı+0,6 mM DENA
- 13 µg/ml deney karışımı+0,6 mM DENA
- ×—× 6,6 µg/ml deney karışımı+0,6 mM DENA

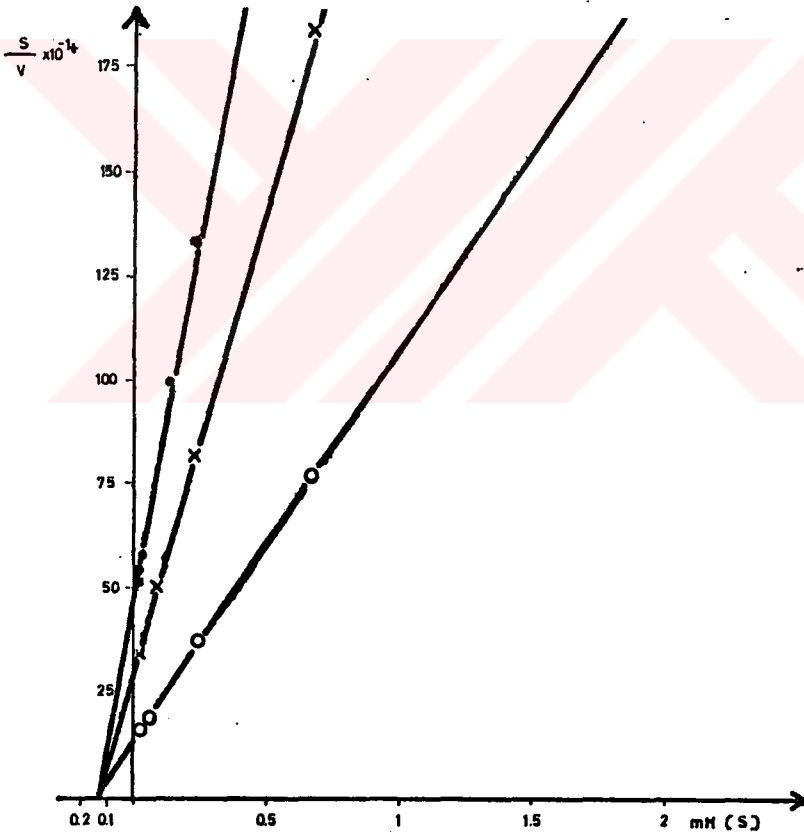
Piruvat kinazın DENA ile inhibisyonunda ADP etkisi incelendiğinde koruyucu etki gözlemlendi. Zaman ve ADP derişimi arttıkça koruyucu etkinin arttığı görüldü (Şekil 5).



Şekil 5: Piruvat kinazın N-Nitrozodietilamin tarafından inhibisyonunda ADP'nin koruyucu etkisi

- Kontrol; X—X 0,6 mM DENA
- 0,26 mM ADP+0,6 mM DENA
- ▲—▲ 0,13 mM ADP+0,6 mM DENA

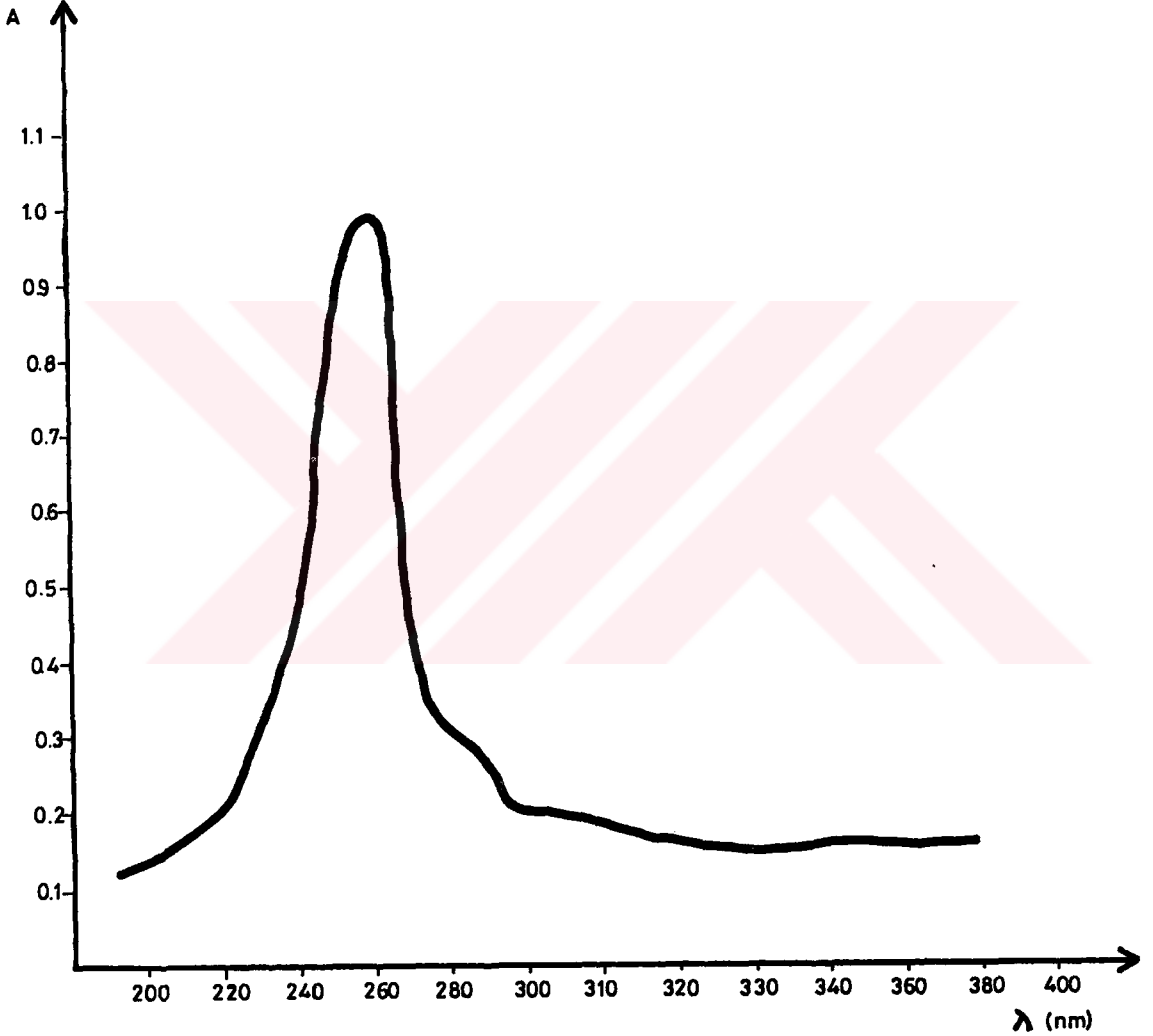
Tavşan kası piruvat kinazının DENA içeren ve içermeyen ortamda PEP'e ilgisi Hanes-Woolf grafiğiyle aşağıda gösterildi. Bulguların Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiklerine uymadığı saptandı. DENA bulunmayan ortamda K_s 0,14 mM V_{max} ise 112 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak hesaplandı. 0,6 mM DENA içeren ortamda K_s 0,14 mM, V_{max} 45 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein ve 1,0 mM DENA içeren ortamda K_s 0,14 mM, V_{max} ise 28 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak bulundu (Şekil 6).



Şekil 6: Tavşan kası piruvat kinazının Fosfoenolpiruvat'a ilgisinin Hanes-Woolf grafikleme yöntemi ile gösterilmesi

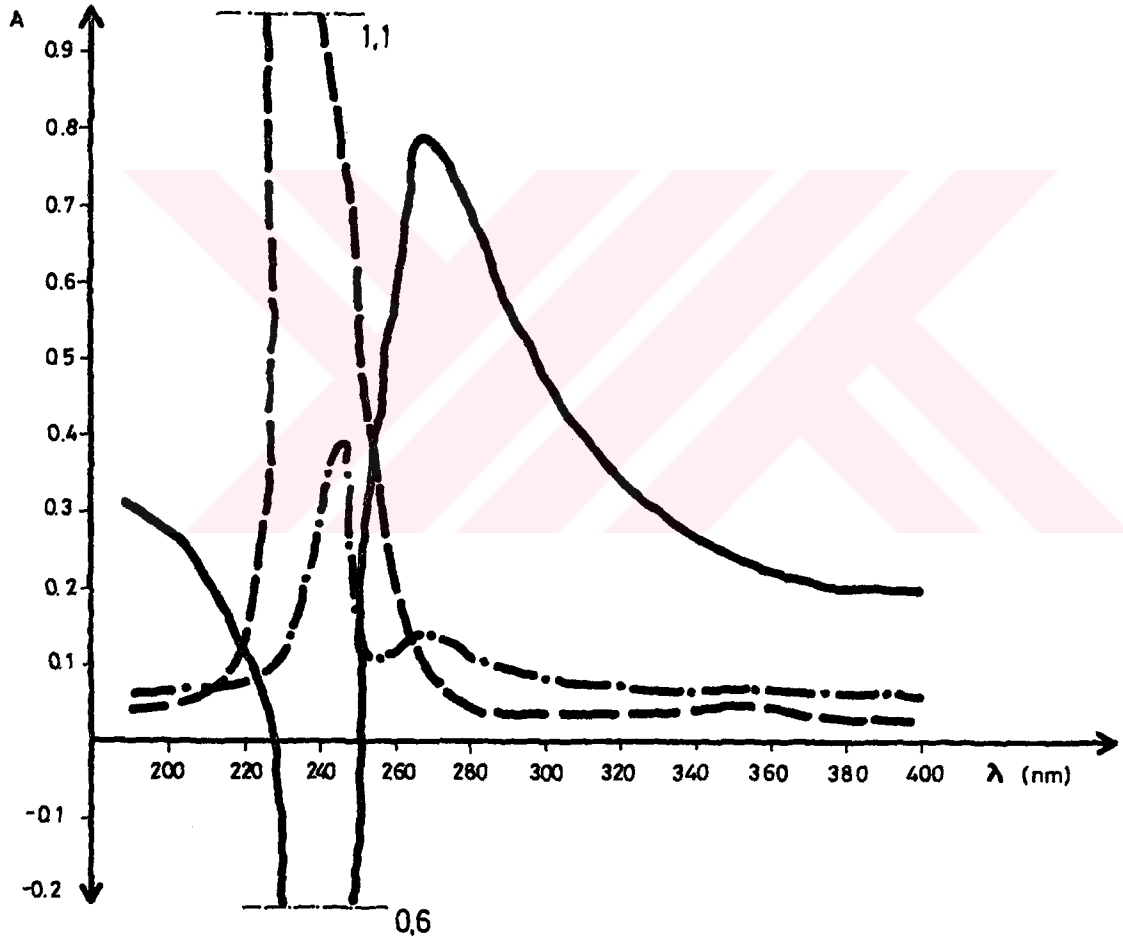
- DENA içermeyen ortamda
- ×—× 0,6 mM DENA içeren ortamda
- 1,0 mM DENA içeren ortamda

Piruvat kinaz ile DENA arasındaki bağlanma özelliklerini saptamak için, enzim DENA ile 37°C de 30 dakika inkübe edildi. Karışımın grafiği aşağıdaki gibi çizildi (Şekil 7).



Şekil 7: İnkübe edilmiş piruvat kinaz ve N-Nitrozodietilaminin diyalizden önceki absorpsiyon grafiği

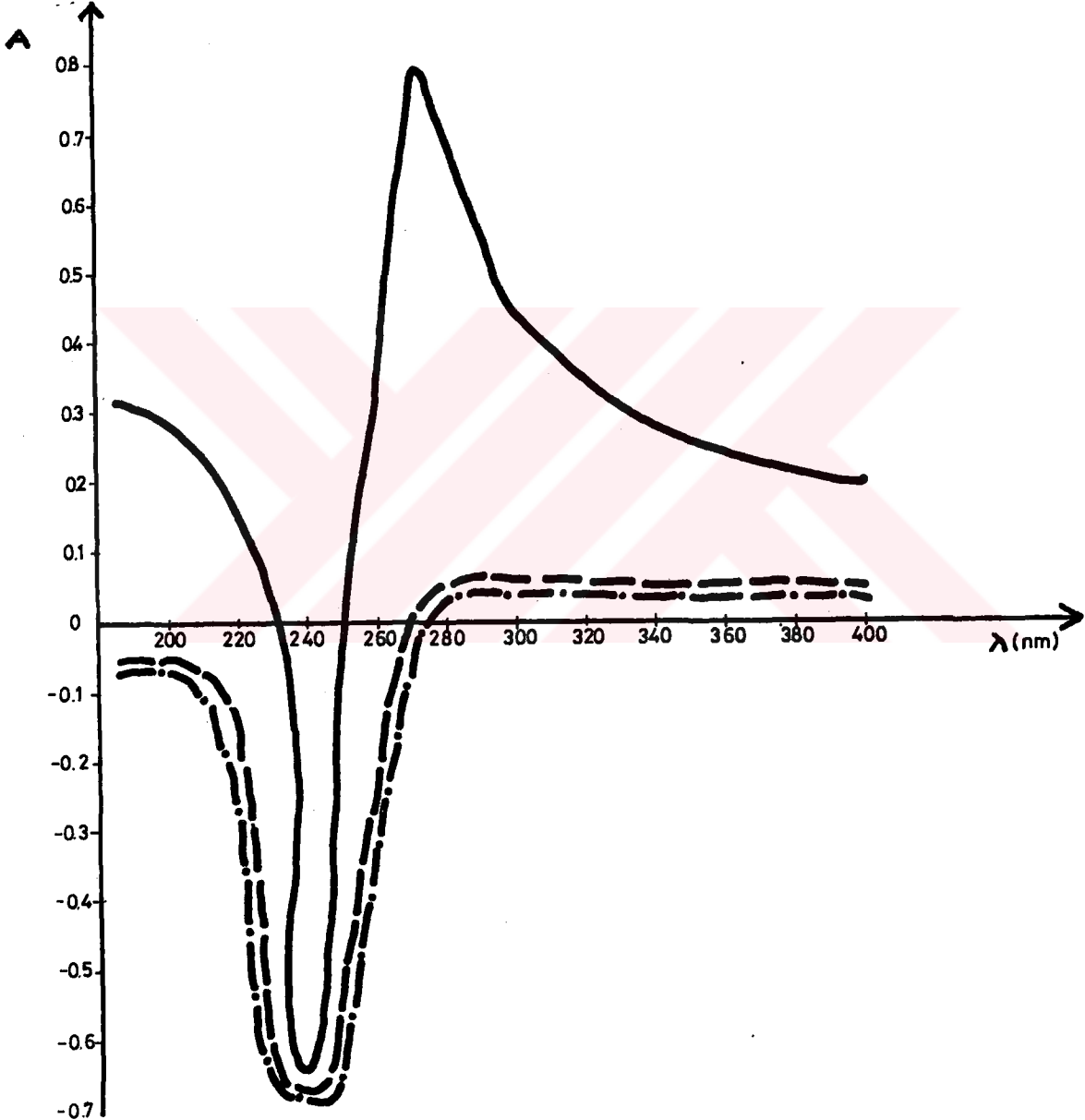
İnkübasyondan sonra enzim-DENA karışımı diyaliz edildi. Diyaliz karışımı, enzim ve DENA'nın absorpsiyon grafikleri aşağıdaki şekilde çizildi. Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası enzim-DENA inkübasyon grafikleri farklı bulundu. Maksimum dalga boyunun 265 nm den 275 nm ye kaydığı gözlemlendi (Şekil 8).



Şekil 8: N-Nitrozodietilamin ile inkübe edilmiş enzimin diyaliz sonrası absorpsiyon grafiği

--- DENA; -.-.- Piruvat kinaz
 — Enzim+DENA diyaliz sonrası

Diyaliz edilmiş piruvat kinaz DENA inkübasyon karışımının absorbands grafiği ile diyaliz sıvılarının absorbands grafiği karşılaştırıldı. Diyaliz sıvılarında gözlenen piklerle, karışımın pikleri farklı bulundu (Şekil 9).

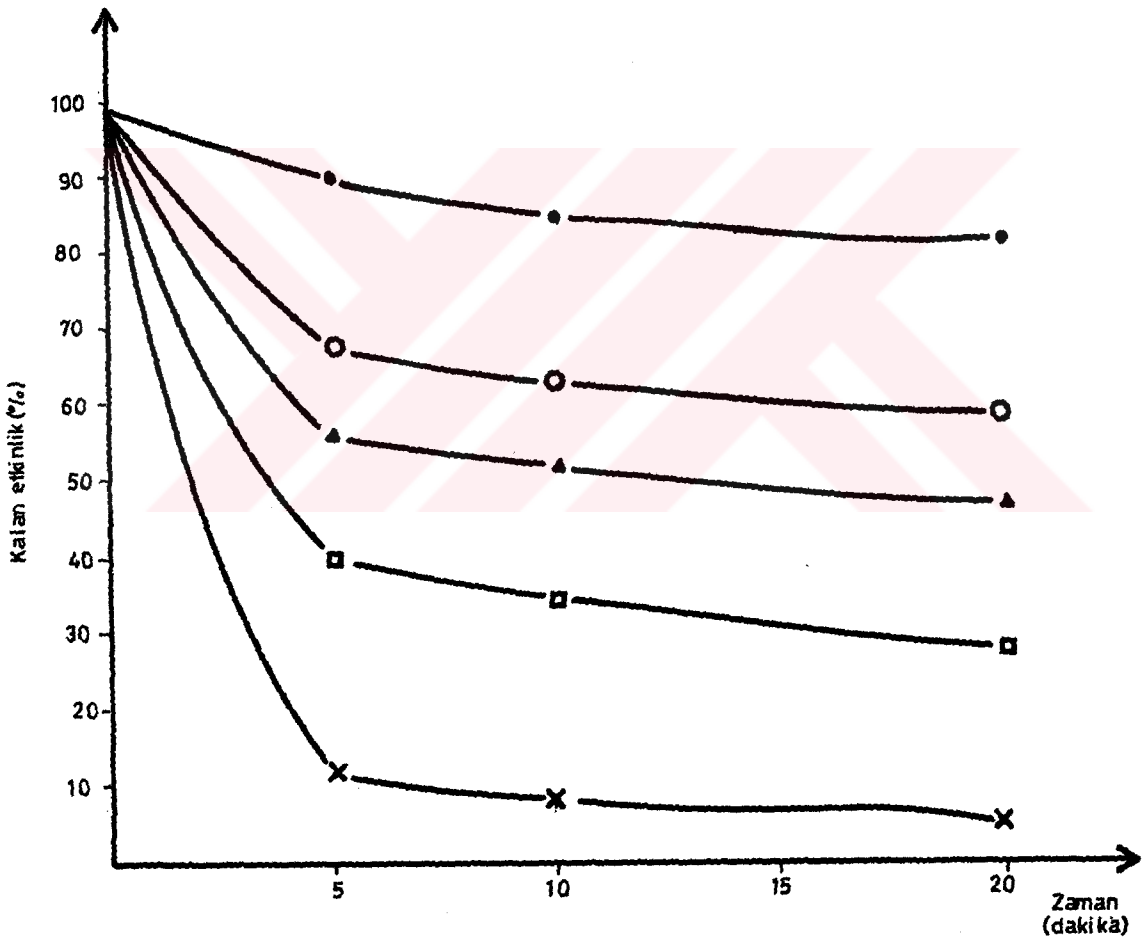


Şekil 9: Diyaliz edilmiş piruvat kinaz N-Nitrozodietilamin karışımının ve diyaliz sıvılarının absorbands grafiği

- Piruvat kinaz+inhibitor
- - - 6 saatlik diyaliz sıvısı
- · - 12 saatlik diyaliz sıvısı

b-G6PDH ÜZERİNE N-NİTROZODİETİLAMİN'İN ETKİSİ, KİNETİK ÇALIŞMALAR VE BAĞLANMA ÇALIŞMALARI

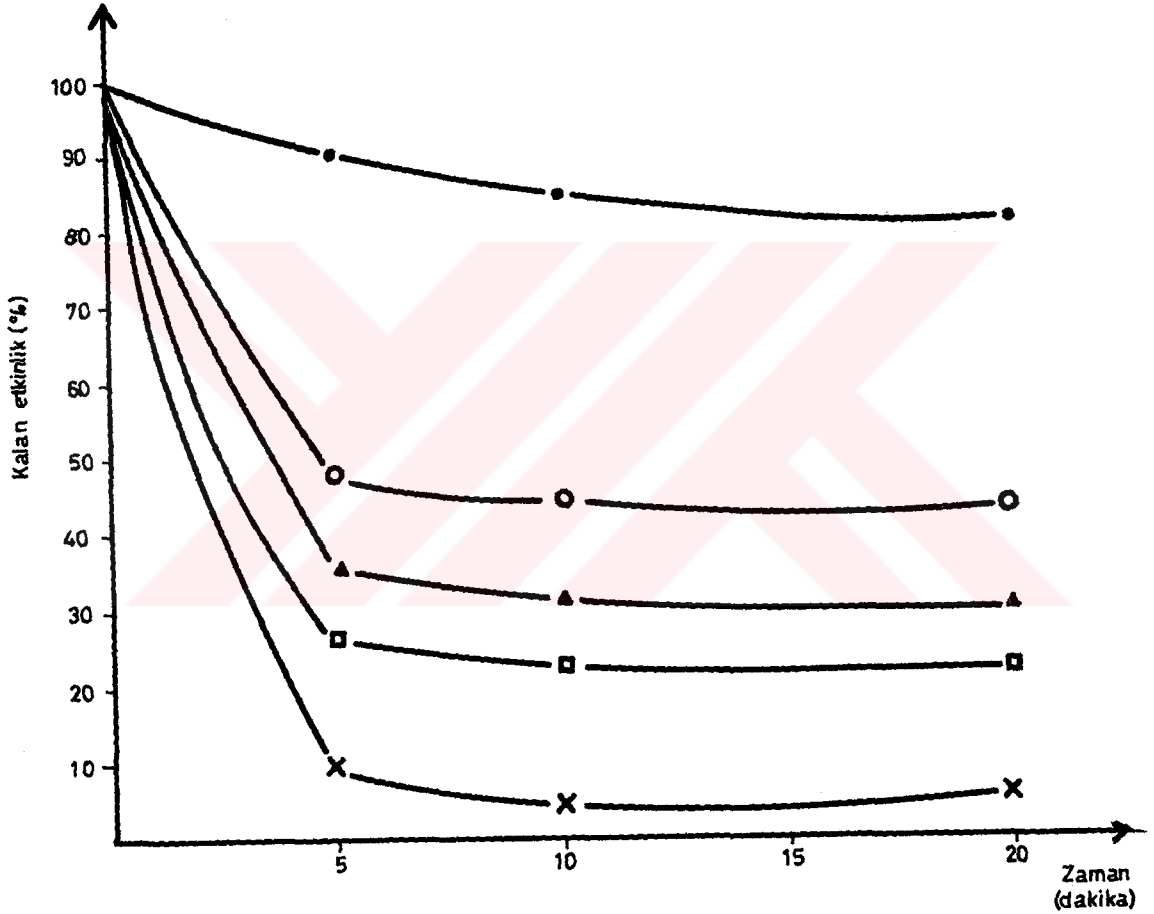
DENA'nın G6PDH üzerine inhibisyon etkisinin zamanla arttığı gözlemlendi. Ayrıca DENA derişimi arttıkça inhibitör etki de arttı. G6PDH'ın % 50 sini inhibe eden DENA derişimi 4,5 mM olarak bulundu (Şekil 10).



Şekil 10: N-Nitrozodietilaminin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

- Kontrol;
- 4,0 mM DENA; ▲—▲ 4,3 mM DENA
- 4,7 mM DENA; ×—× 5 mM DENA

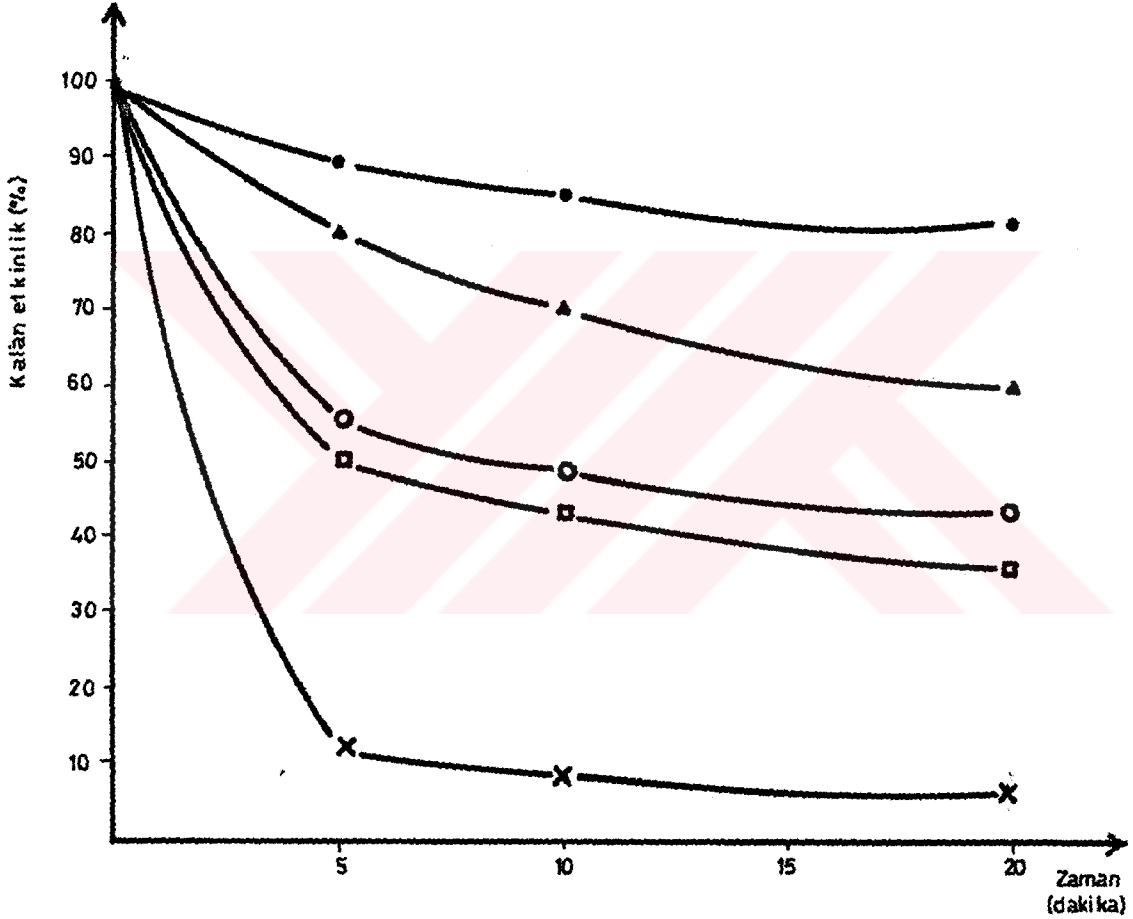
Asetaldehitin G6PDH üzerine inhibisyon etkisinin zamanla ve asetaldehit derişimiyle arttığı gözlemlendi. G6PDH'ın % 50 sini inhibe eden asetaldehit derişimi 26 mM olarak bulundu (Şekil 11).



Şekil 11:Asetaldehitin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkisi

- Kontrol;
- 30 mM Asetaldehit; ▲—▲ 33 mM Asetaldehit
- 40 mM Asetaldehit; ×—× 60 mM Asetaldehit

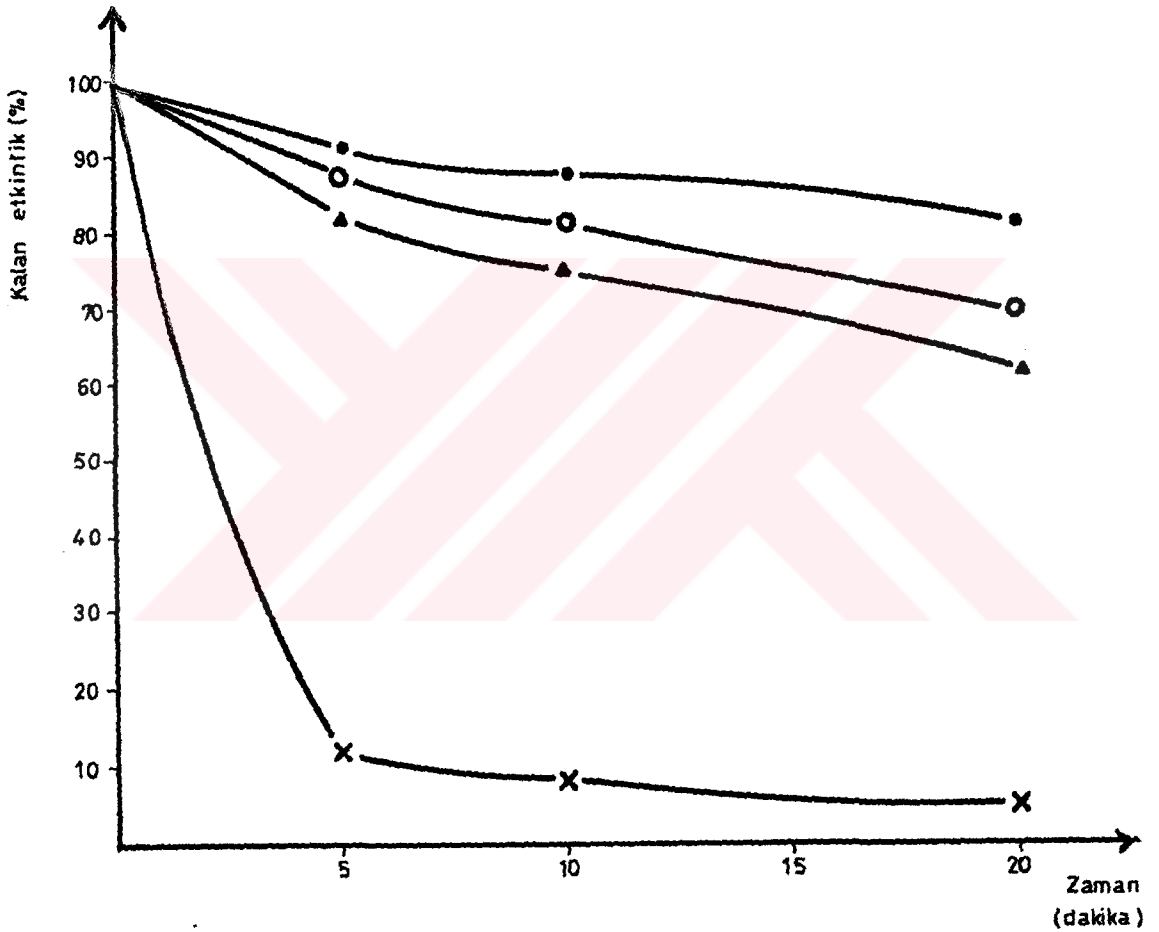
G6PDH'in DENA ile inhibisyonunda BSA koruyucu etki gösterdi. Zamanla ve artan BSA derişimiyle koruyucu etki arttı (Şekil 12).



Şekil 12: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz N-Nitrozodietilamin ile inhibisyonunda sığır serum albümininin koruyucu etkisi

- Kontrol; X—X 5 mM DENA
- ▲—▲ 33 µg BSA/ml Deney karışımı+5 mM DENA
- 13 µg BSA/ml Deney karışımı+5 mM DENA
- 6,6 µg BSA/ml Deney karışımı+5 mM DENA

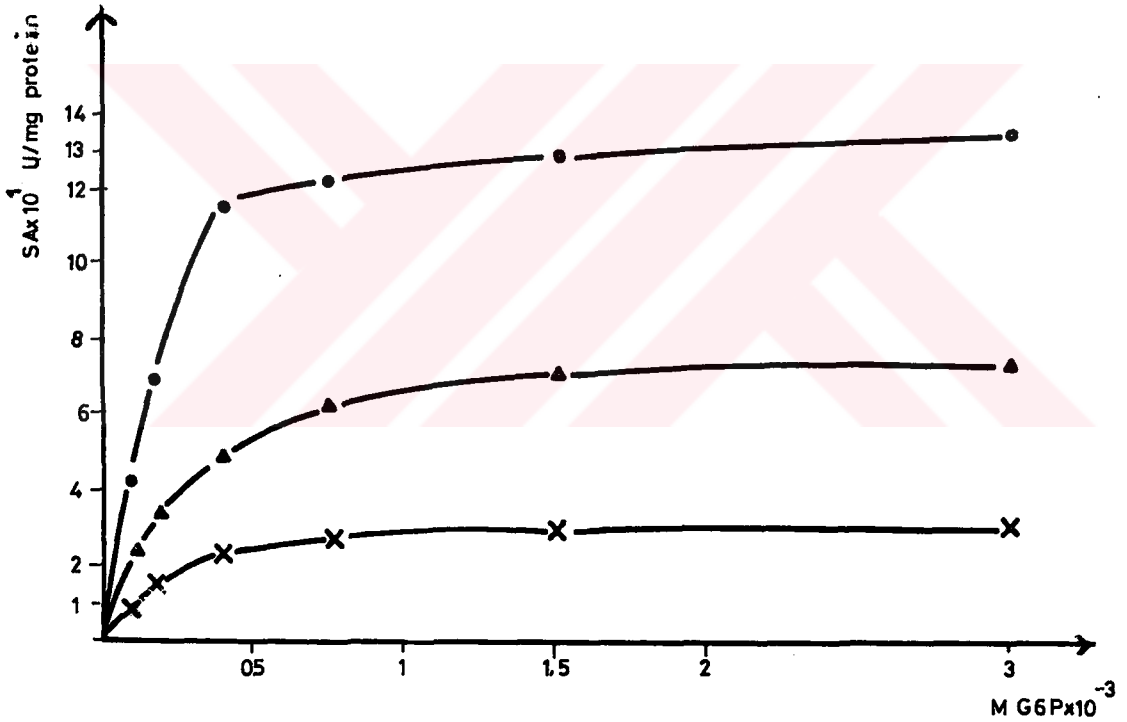
G6PDH'in DENA ile inhibisyonunda NADP'nın koruyucu etkisi olduğu gözlemlendi. Bu etki, zaman ve NADP derişimi arttıkça çoğaldı (Şekil 13).



Şekil 13:Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ın N-Nitrozodietilamin ile inhibisyonunda NADP'nın koruyucu etkisi

- Kontrol; ×—× 5 mM DENA
- 0,32 mM NADP+5 mM DENA
- ▲—▲ 0,18 mM NADP+5 mM DENA

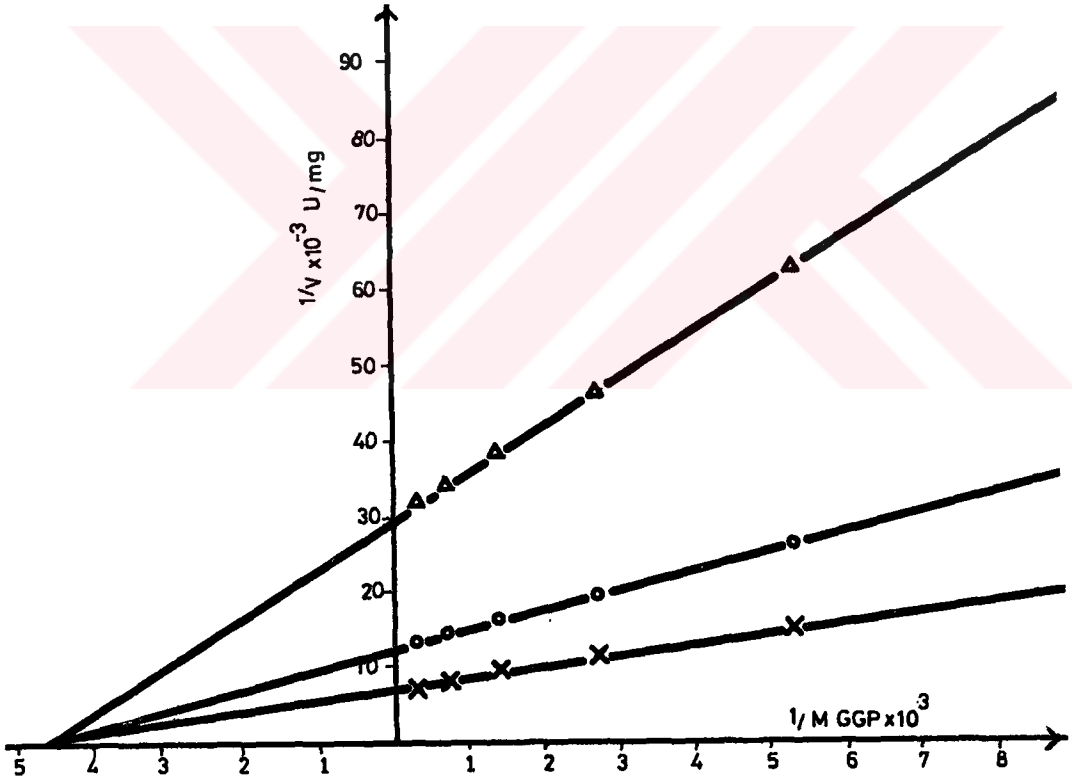
G6PDH'ın substrat doymuşluk eğrisi, değişik glikoz 6 fosfat derişimlerinde aktivite çalışılarak çizildi. Km ve Vmax hesabı yapıldı. Michaelis-Menten'e göre DENA içermeyen ortamda Km 0,22 mM, Vmax ise 135 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak bulundu. 5,0 mM DENA içeren ortamda Km 0,22 mM, Vmax ise 35 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein, 4,3 mM DENA içeren ortamda Km 0,22 mM, Vmax ise 75 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak bulundu (Şekil 14).



Şekil 14: N-Nitrozodietilamin inhibisyonunda substrat (Glukoz-6-fosfat) derişiminin etkisi

●—● 0 mM DENA; ▲—▲ 4,3 mM DENA
 ×—× 5,0 mM DENA

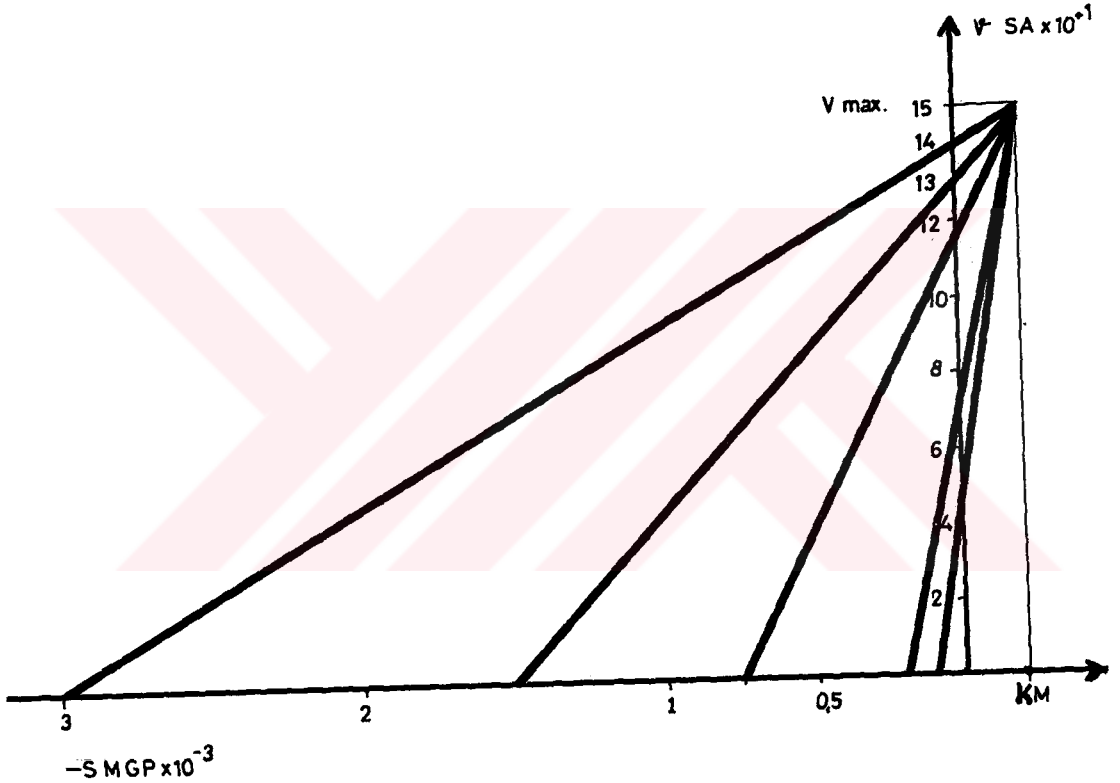
Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{max} hesabı, hem G6PDH için, hemde inhibitör+G6PDH karışımı için yapıldı. DENA yokken G6PDH'in K_m 'i 0,22 mM, V_{max} 'ı 140 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein bulundu. 5 mM DENA+G6PDH için K_m 0,22 mM V_{max} 31 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein, 4,3 mM DENA+G6PDH karışımı için K_m 0,22 mM V_{max} ise 81 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein bulundu. Bulgular nonkompetatif inhibisyonu gösteriyordu (Şekil 15).



Şekil 15: Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın N-Nitrozodietilamin ile inhibisyonunda Lineweaver-Burk grafiği

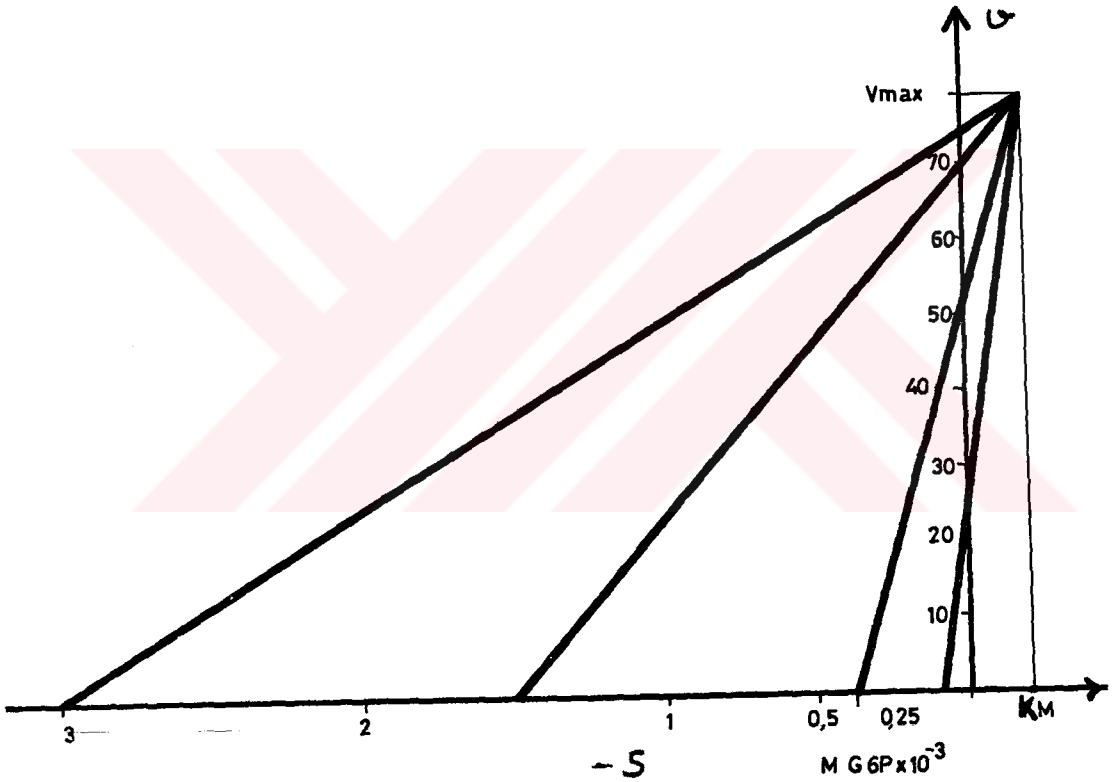
▲—▲ 5 mM DENA; ○—○ 4,3 mM DENA
 ×—× 0 mM DENA

Aynı veriler G6PDH için Eisenthal-Cornish-Bowden direkt lineer grafiğine uygulandı. K_m 0,21 mM, V_{max} 150 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak bulundu (Şekil 16).



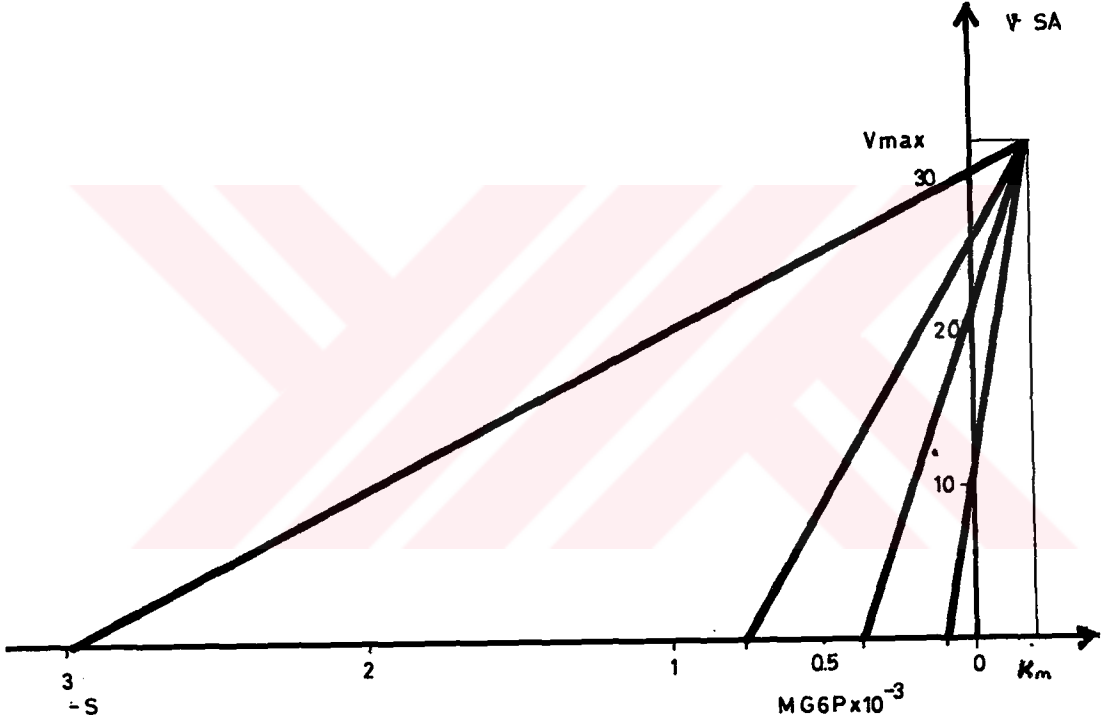
Şekil 16: Glukoz-6-fosfat dehidrogenazın değişik substrat derişim-
lerindeki verilerinin Eisenthal-Cornish-Bowden direkt
lineer grafiğıyle gösterilmesi

4,3 mM DENA+G6PDH karışımı için Eisenthal-Cornish-Bowden direkt lineer grafiği çizildi. K_m 'i 0,21 mM, V_{max} 79 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein bulundu (Şekil 17).



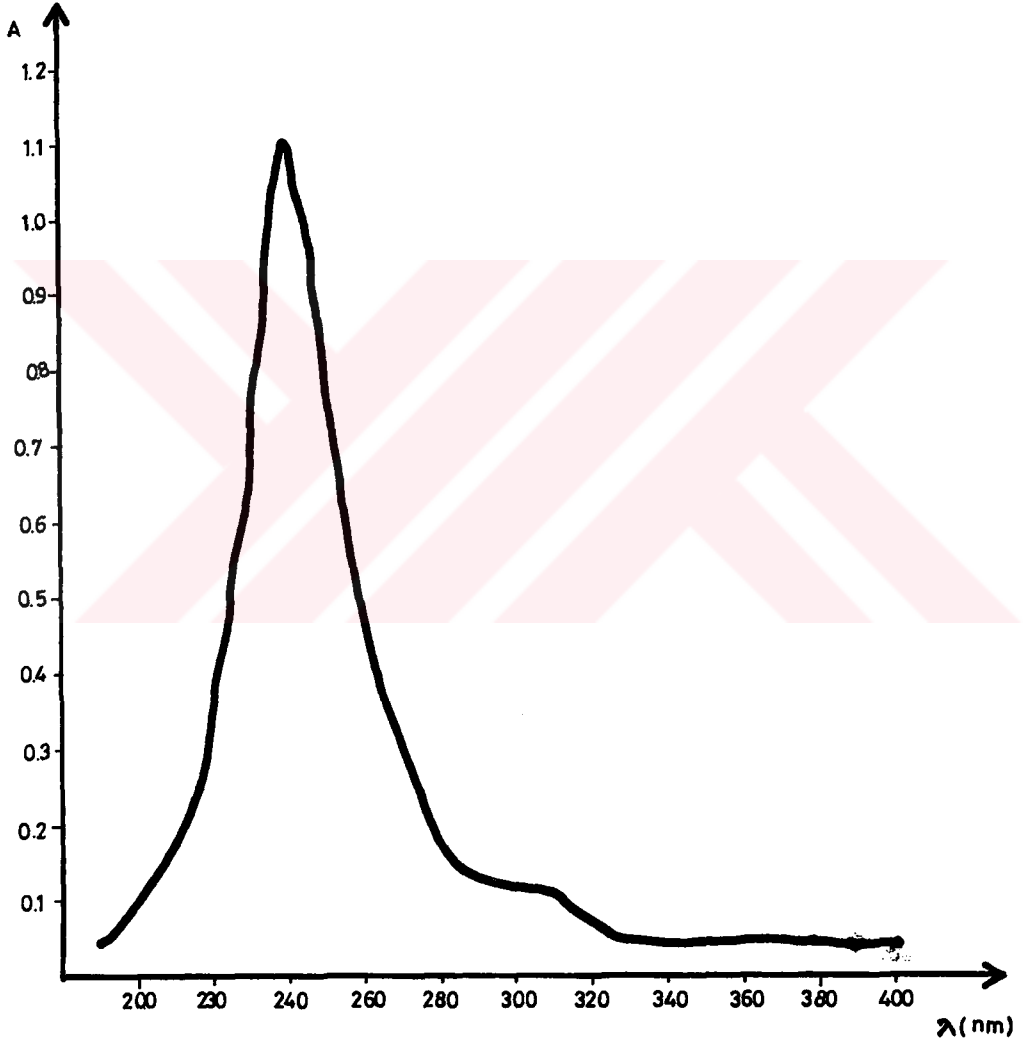
Şekil 17: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz+4,3 mM N-Nitrozodietilaminin Eisenthal-Cornish-Bowden direkt lineer grafiği

5 mM DENA+G6PDH için Eisenthal-Cornish-Bowden direkt lineer grafiğinden K_m 0,21 mM, V_{max} 32,5 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein bulundu (Şekil 18).



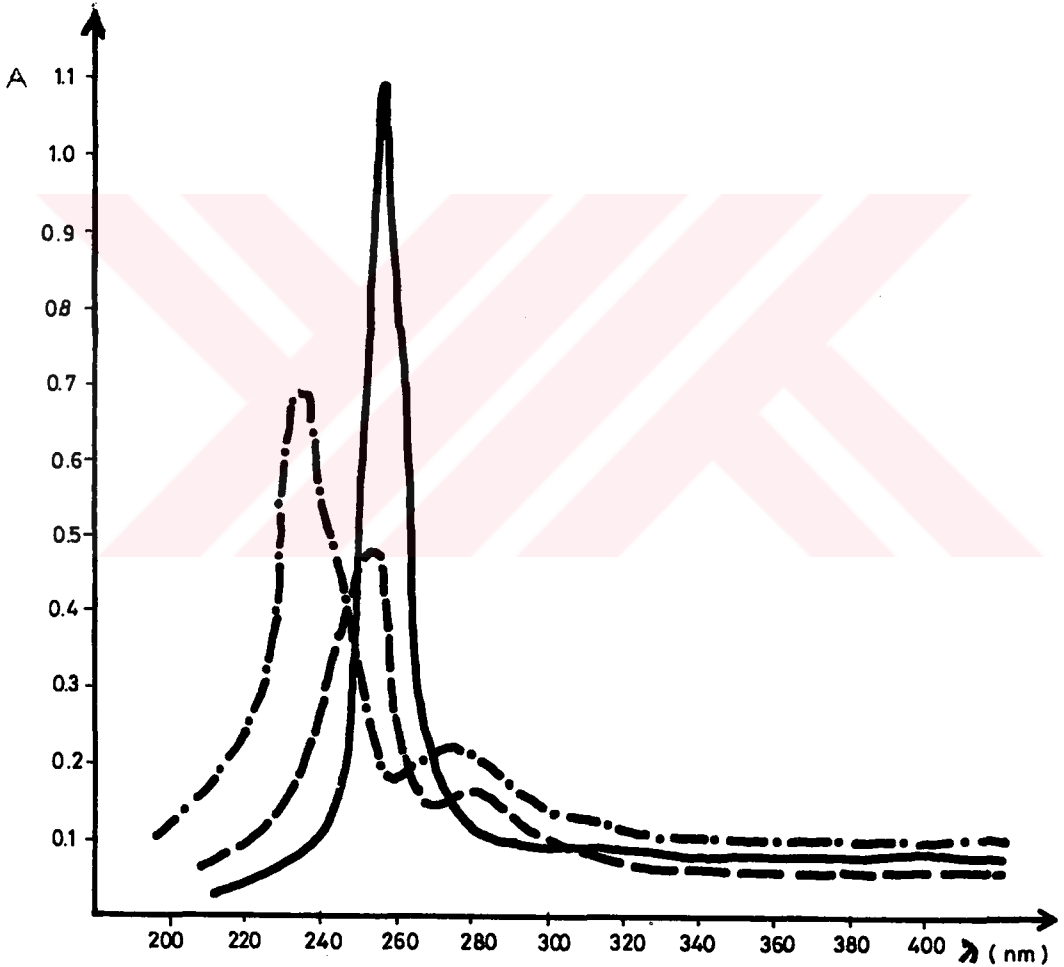
Şekil 18: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz+5 mM N-Nitrozodietilaminin Eisenthal ve Cornish-Bowden direkt lineer grafiği

DENA'nın G6PDH'a bağlandığını göstermek amacıyla ikisi 37° C de 30 dakika inkübe edilip absorpsiyon grafikleri çizildi (Şekil 19).



Şekil 19:İnkübe edilmiş enzim+inhibitör karışımının diyalizden önceki absorpsiyon grafiği

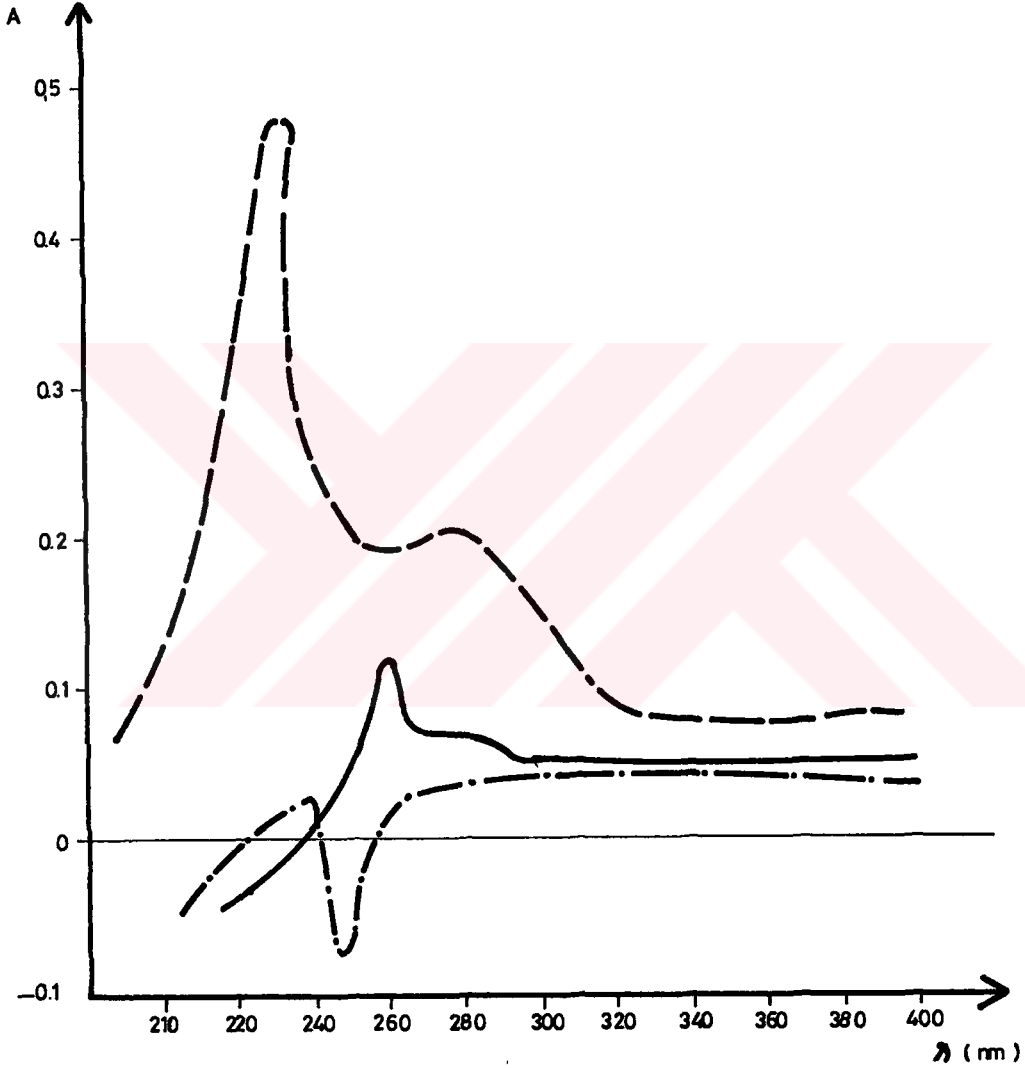
İnkübe edilmiş enzim DENA karışımı daha sonra diyaliz edilerek absorpsiyon grafiği çizildi. Diyalizden önce 240 nm olan maksimum dalga boyu 230 nm'ye kaydı. Diyaliz karışımının ve serbest DENA ve serbest enzimin pikleri farklıydı (Şekil 20).



Şekil 20: N-Nitrozodietilamin ile bağlanmış enzimin absorpsiyon grafiği

— Serbest DENA; - - - Serbest enzim
 - · - · Diyaliz sonrası G6PDH+DENA

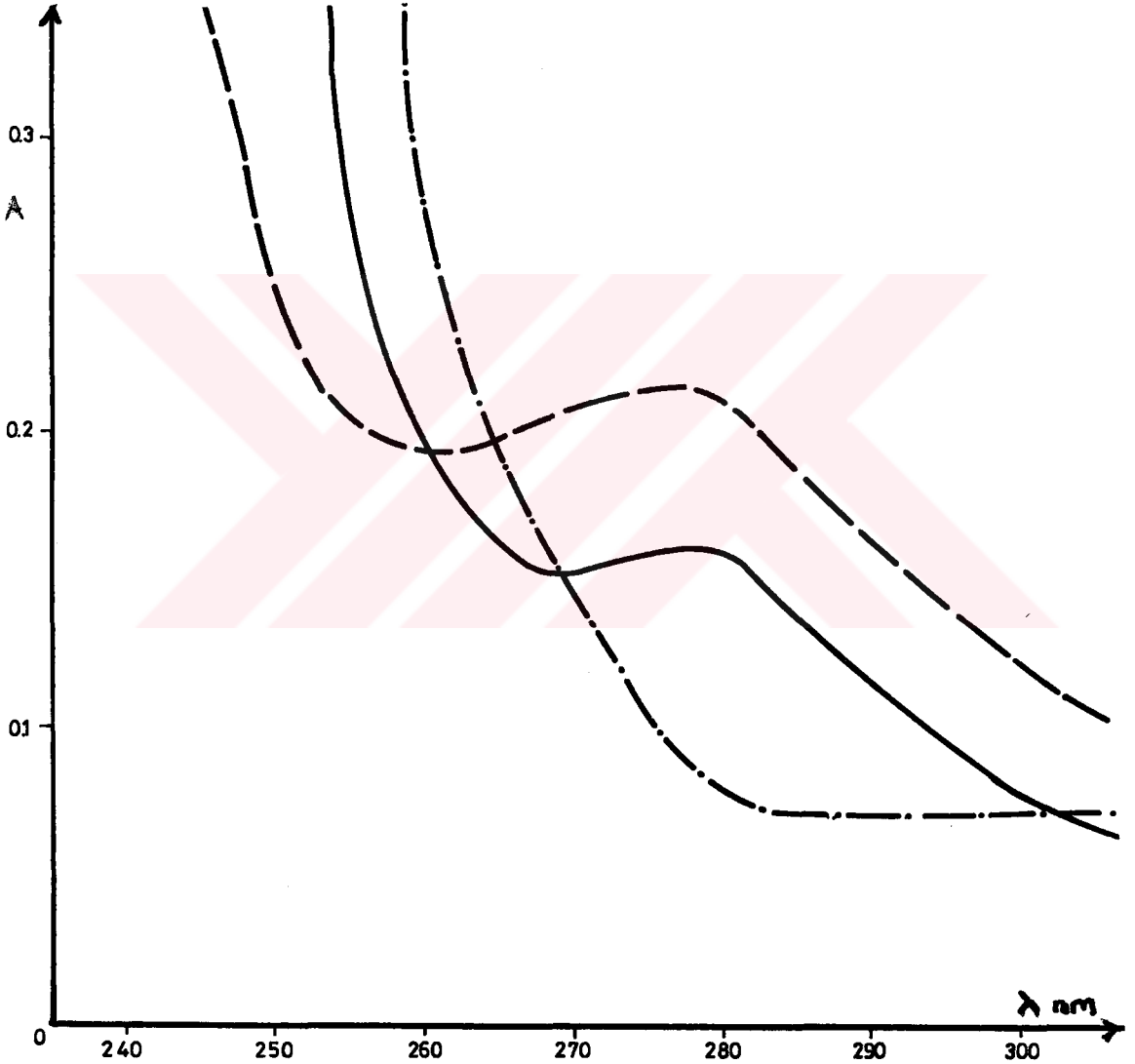
Diyaliz sıvıları ile diyaliz sonrası inkübasyon karışımının pikleri birbirinden farklı bulundu (Şekil 21).



Şekil 21: Diyaliz edilmiş G6PDH+N-Nitrozodietilamin karışımının ve diyaliz sıvılarının absorbans grafiği

- — — Enzim+inhibitör
- · — 6 saatlik diyaliz sıvısı
- — — 12 saatlik diyaliz sıvısı

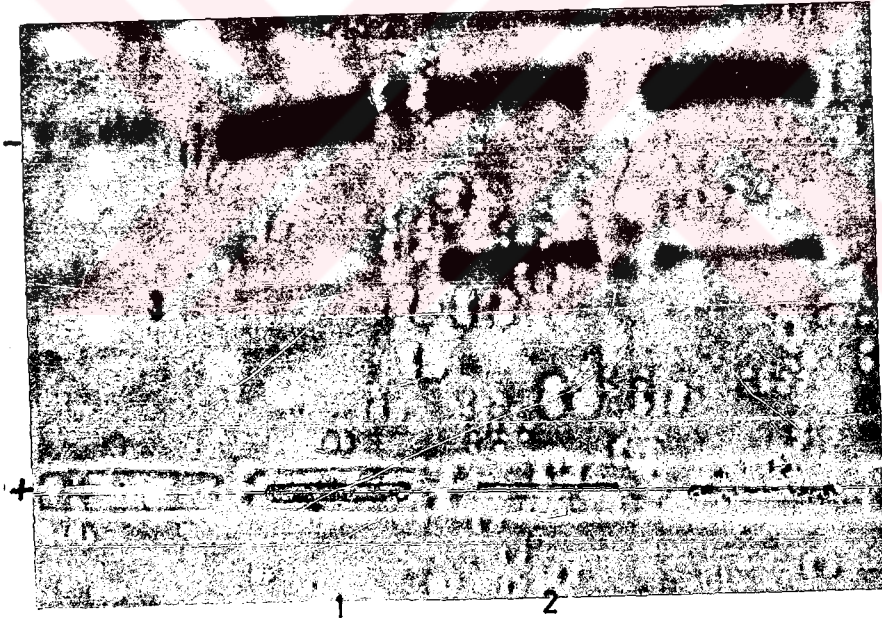
Serbest enzim ve diyaliz sonrası enzim karşılaştırıldığında 270 nm'deki kıvrımın 260 nm'ye kaydığı görüldü (Şekil 22).



Şekil 22: N-Nitrozodietilamin ile bağlanmış glukoz-6-fosfat dehidrogenazın genişletilmiş absorpsiyon grafiği

— Serbest enzim; -·- Serbest DENA
 --- Diyaliz sonrası enzim+DENA

Bağlanma çalışması diyalizin yanı sıra poliakrilamid jel elektroforeziyle de gösterildi. G6PDH'ın direkt ve 500 mM DENA ile inkübasyon karışımından elde edilen bantlar aşağıdaki şekilde bulundu (Şekil 23). 2 numara direkt G6PDH ın verdiği fotograftır. Fotografta çift bant gözlemlendi. 1 numara ise G6PDH+500 mM DENA karışımının fotoğrafıdır ve sadece bir bant saptandı. Buradanda DENA'nın G6PDH enzimine bağlandığı görüldü.



Şekil 23:Enzim ve N-Nitrozodietilamin+Enzim karışımının poliakrilamid jel elektroforezindeki hareketi

DENA'nın metabolitinin asetaldehit olduğu, HPLC uygulanmasıyla gösterildi. % 60 asetonitril su karışımı 3 ml/dak da 2000 psi basınç altında Econasil-C-18 kolonundan geçirildi. 5 µl örnek uygulandı. Kağıt hızı 0,5 cm/dak, λ254 nm idi. Birinci pik 0,012 mM standart asetaldehiti, ikinci pik ise 2,5 mM DENA'dan oluşan asetaldehiti göstermektedir (Şekil 24).

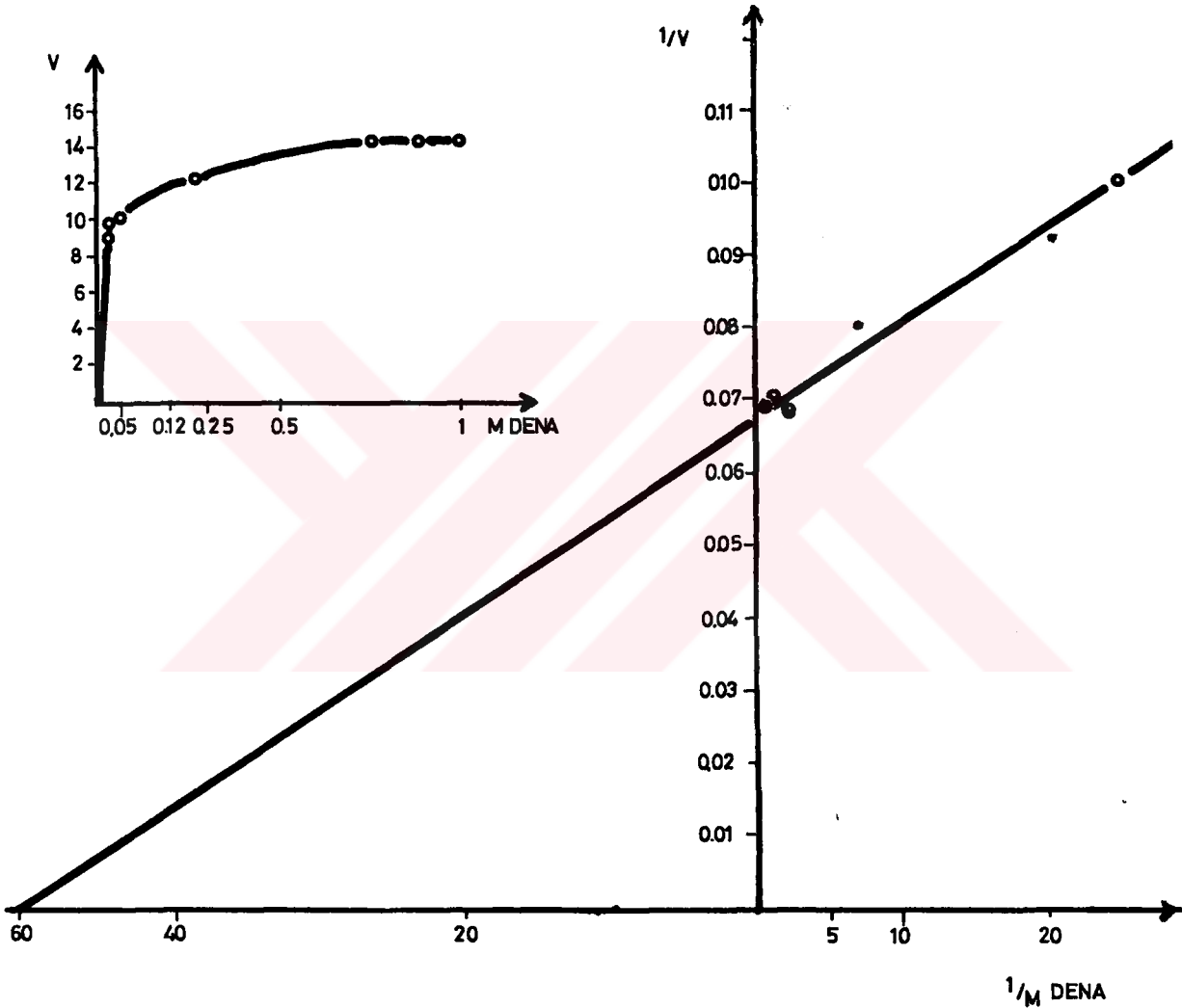


Şekil 24:Asetaldehitin yüksek basınçlı sıvı kiomotografisi grafiği

1.Pik standart asetaldehit

2.Pik N-Nitrozodietilaminden oluşan asetaldehit

Değişik molaritedeki DENA çözeltisinden asetaldehitin oluşum hızı çalışıldı. Km 0,016 M DENA, Vmax 14,9 μ mol asetaldehit/dak/mg protein olarak bulundu (Şekil 25).



Şekil 25: Rat mikrozoomuyla N-Nitrozodietilaminin oksidatif dealkilasyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafikleriyle gösterilmesi.

V = μ mol CH_3CHO /dak/mg mikrozoomal protein

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, kanserojen ve mutajen bir madde olan DENA'nın ve başlıca kararlı metaboliti olan asetaldehitin G6PDH ve piruvat kinaza in vitro etkisi incelendi. DENA'nın enzimlere bağlanıp bağlanmadığını bulmak için diyaliz ve poliakrilamit jel elektroforezi yöntemleri kullanıldı. Ayrıca DENA mikrozom sistemiyle inkübe edilip metabolizması çalışıldı.

Yaptığımız bu in vitro araştırmada, piruvat kinaz ve G6PDH enzimlerini çeşitli derişimlerde DENA ile inkübe ettik. Denenen inkübasyon koşullarında piruvat kinazın % 50 sini inhibe eden DENA derişimi 0,38 mM olarak bulunmuştur. DENA'nın metaboliti olan asetaldehitin 36 mM derişimindeki çözeltisi piruvat kinazın % 50 sini inhibe etmiştir. Asetaldehitin enzim inhibisyon gücü DENA'ya göre yüz kat daha azdır. 0,6 mM DENA piruvat kinazı % 85 inhibe etmektedir. İnkübasyon ortamına 6,6 µgm/ml BSA ilavesiyle % 81'e, 13 µgm/ml BSA ilavesiyle % 75 e 33 µgm/ml BSA ilavesiyle ise % 50'ye düşmektedir. İnkübasyon ortamına ADP katılmasıyla da DENA'

nın piruvat kinazı inhibisyon etkisi azalmaktadır. 0,6 mM DENA tek başına % 85 inhibisyon yaptığı halde, 0,13 mM ADP ilavesiyle inhibisyon % 61'e, 0,26 mM ADP ilavesiyle % 35'e, 0,52 mM ADP ilavesiyle ise % 15'e düşmektedir. Yani ADP derişimi arttıkça koruyucu etki de artmaktadır.

G6PDH ile ilgili bulgularımızsa şöyledir. G6PDH'in % 50'sini inhibe eden DENA derişimi 4,5 mM, asetaldehit derişimi ise 26 mM dir. Ortama BSA veya NADP ilavesiyle DENA'nın inhibisyon etkisi azalmaktadır. 5 mM DENA G6PDH'ı % 90 inhibe ederken, 6,6 µgm/ml BSA ilavesiyle inhibisyon % 60'a, 13 µgr/ml BSA ilavesiyle % 50'ye, 33 ugm/ml BSA ilavesiyle % 30'a düşmektedir. Yine 0,18 mM NADP, % 90 lık inhibisyonu % 35'e, 0,36 mM lık NADP ise % 28'e düşürmektedir.

Kanserojen bileşiklerin enzim proteinlerine bağlandığı bilinmektedir. DENA, enzimlere bağlanarak onları inhibe etmektedir. BSA'nın koruyucu etkisi, büyük bir olasılıkla inhibitörün enzim yerine BSA'ya bağlanmasıyla olmaktadır. BSA'nın protein yoğunluğu enzime göre daha fazladır. DENA, BSA'yı tercih ettiğinden daha fazla enzim serbest kalarak işlevini sürdürmektedir. İnkübasyon ortamında protein yoğunluğunun artmasıyla DENA'nın enzime olan inhibisyon gücü azalmaktadır. Bu da DENA

moleküllerin öncelikle ortamda daha çok bulunan BSA'ya bağlandığını gösterir.

DENA'nın her iki enzimle inkübasyonundan sonra saptanan inhibisyon, ortama koenzimlerin ilavesiyle azalmaktadır. Bu etki koenzimlerin protein konformasyonunu stabilize etmesi nedeniyle (54).

G6PDH ile yaptığımız kinetik çalışmalar sonucu, DENA'nın G6PDH'ı nonkompetitif olarak inhibe ettiğini bulduk. Maya G6PDH'ının, glukoz 6 fosfat için K_m değerini 0,22 mM, V_{max} değerini ise 140 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein bulduk. 4,3 mM DENA için K_m 0,22 mM, V_{max} ise 81 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein idi. 5 mM DENA için K_m 0,22 mM, V_{max} ise 31 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein bulunmuştur. K_m 'lerin aynı olması, DENA'nın G6PDH'ı nonkompetitif olarak inhibe ettiğini gösterir.

Yaptığımız çalışmalar DENA'nın piruvat kinazı da nonkompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir. DENA bulunmayan ortamda tavşan kası piruvat kinazı için K_s 0,14 mM, V_{max} ise 112 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak hesapladık. 0,6 mM DENA içeren ortamda K_s 0,14 mM, V_{max} 45 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein ve 1.0 mM DENA içeren ortamda K_s 0,14 mM, V_{max} ise 28 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak bulduk.

Yukarıdaki sonuçlar DENA'nın G6DPH'ı ve piruvat kinazı nonkompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir. Yani DENA, enzimin aktif merkezi^{ne ya da} dışında bir bölgeye bağlanıp enzimin şeklini değiştirmektedir. Bemis ve arkadaşları, ışık yayılması ve optikal rotasyon dispersiyonu yöntemiyle DENA'nın proteinleri denatüre etme gücünü araştırmışlardır. Model protein olarak ovalbümin kullanıp, DENA'nın proteinlerde helix-coil geçişi yaptığını ve ovalbüminin fonksiyonel gruplarıyla, DENA arasında hidrojen bağlanması olduğunu göstermişlerdir. Nitrozaminler, nitrozo oksijen atomuyla, proteinlerin karboksil ve fenolik hidroksil grubuna, hidrojen bağlanması yapmaktadır (55).

Atalay, in vitro olarak DENA'nın laktat dehidrogenazı inhibe ettiğini göstermiştir (56). Yine aynı araştırmacı, fare karaciğer 10.000Xg süpernatantını enzim kaynağı olarak kullanarak malat dehidrogenaz aktivitesine bakmış, 8 µgm/ml enzimin % 50 sini inhibe eden DENA derişimini 0,24 mM olarak saptamıştır. Ayrıca, DENA'nın enzime olan inhibisyon gücünün NADH ve BSA ilavesiyle azaldığını bulmuştur (57). Yine Atalay ve Aker, DENA'nın maya G6PDH'ını inhibe ettiğini, BSA veya NADP ilavesinin inhibisyonu azalttığını göstermişlerdir (58). Bu araştırmaların bulguları bizimkiler ile uygunluk göstermektedir.

Poirier ve Poirier, yaptıkları araştırmada DENA verilen farelerin karaciğerlerinin sitoplazmik kısmındaki serin hidroksimetilaz, dihidrofolat redüktaz, formilaz ve ürokinaz enzim aktivitelerinin azaldığını saptamışlardır (59). Teras ve Kildema, DENA verilen farelerde karaciğer hekzokinaz, piruvat kinaz ve G6PDH aktivitelere bakmışlardır. Zamanla bu enzim aktivitelerinde artış saptamışlardır (60). Giuliani ve arkadaşları da yaptıkları araştırmada, DENA verilen farelerde karaciğer dokusunda glikoz-6-fosfataz, aspartat transaminaz, alanin transaminaz aktivitelerinin kontrollere göre azaldığını, alkalen fosfataz aktivitelerinin arttığını saptamışlardır (61). Özkurt, ise DENA uygulanan farelerin karaciğerlerinde zamanla sitrat sentaz aktivitesinde azalma, LDH aktivitesinde artış saptamıştır (62). Yani in vivo olarak bazı enzim aktiviteleri artarken, bazıları azalmaktadır. Aktivitesi azalan enzimlere DENA ve metabolitlerinin bağlandığı düşünülebilir. Ayrıca, DENA'nın DNA'ya bağlanmasıyla bu enzimlerin sentezi engelleniyor olabilir. İn vitro olarak DENA, direkt enzimle etkileştiği halde, in vivo olarak DENA metobolize edilip değişik maddelerin varlığında enzimle etkileşmektedir.

DENA'nın enzimleri nasıl etkilediğini anlamak amacıyla diyaliz ve poliakrilamid elektroforezi yöntemleri kulla-

nıldı. Enzim-DENA karışımının diyalizden önce elde edilen absorbans grafiği ve serbest enzimle, serbest DENA'nın absorbans grafikleri, enzim+DENA karışımının diyaliz sonrası grafiğinden farklı bir görünüm vermektedir. Her iki enzimde de protein zirveleri, diyalizden sonra farklı dalga boylarına kaymıştır. Bu da DENA'nın enzim proteinine bağlanıp, absorbansını değiştirdiğini gösterir. Poliakrilamit jel elektroforezinde serbest enzimle, DENA+Enzim karışımının verdiği bantlar farklıdır. Serbest G6PDH enziminde bulunan bandın biri, DENA-Enzim karışımında kaybolmakta, diğer bant ise kalınlaşmaktadır. Bu da DENA'nın enzime bağlandığını gösterir. Bu iki deneydeki bulgularımız da, kinetik bulgularımızı desteklemektedir.

DENA'nın oksidatif dealkilasyon kinetiğini, indüklenmiş mikrozoamlarda, DENA'nın inkübasyonu boyunca asetaldehit oluşumuyla inceledik. Michaelis-Menten kinetiğini izlediğini bulduk. Lineweaver-Burk grafiğinden K_m 0,016 M, V_{max} 14,9 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olarak hesapladık.

Magaur ve Nievel indükleyici uygulanan ratlarda DENA'nın metabolizmasını çalışmışlardır. Bunlar in vitro olarak asetaldehit oluşumunu ölçmüşlerdir. DENA'nın ilaç metabolizması enzim aktivitesini ve karaciğer

mikrozom fraksiyonunun protein kapsamını azalttığını görmüşlerdir. Ayrıca DENA'nın deetilasyon enzimlerinin de novo sentezini inhibe ettiğini bulmuşlardır (63).

Chau ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, DENA'nın oksidatif dealkilasyonu sonucu asetaldehit oluştuğunu görmüşlerdir (64). Bu iki araştırma da bulgularımızı desteklemektedir.

Gerek DENA, gerekse asetaldehit kanserojen maddelerdir. İn vivo olarak yapılan çalışmalarda kimyasal kanserojenlerden oluşan elektrofillerin protein ve nükleik asitlerdeki çeşitli nükleofilik atomlarla, kovalent bağlar yaptığı saptanmıştır (65). Proteinlerde değişikliğe uğratılan nükleofilik atomlar, metiyonin ve sisteindeki kükürt, histidindeki halka azotu ve tirozindeki üçüncü karbon atomu olarak tesbit edilmiştir (66).

Nitrozaminlerle ilgili çalışmalar son zamanlarda yoğunluk kazanmıştır. Doğada yaygın olarak bulunan DENA, nükleik asitleri alkillemesi yanında canlı enzimlerinide fonksiyonel gruplarına bağlanarak inhibe etmektedir. Bu çalışmada DENA'nın G6PDH ve piruvat kinaza etkisi ile metabolizması incelenmiştir.

ÖZET

Bu çalışma, maya glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ın ve tavşan kası piruvat kinazının N-Nitrozodietilamin ile inhibisyonunu, sığır serum albümini ve koenzimlerin koruyucu etkisini, N-Nitrozodietilamin'in her iki enzime bağlanma özelliklerini ve N-Nitrozodietilamin'in metabolizmasının incelenmesini amaçlamıştır.

Deney sırasında uygulanan inkübasyon koşullarında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ın % 50'sini inhibe eden N-Nitrozodietilamin derişimi 4,5 mM, asetaldehid derişimi ise 26 mM idi. İnkübasyon ortamına 13 µgm/ml. sığır serum albümini veya 0,1 mM NADP ilavesiyle N-Nitrozodietilamin inhibisyonu % 50'ye düşmektedir. Ayrıca N-Nitrozodietilamin'in glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ı nonkompetatif olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Piruvat kinazın % 50'sini inhibe eden N-Nitrozodietilamin derişimi 0,38 mM asetaldehit derişimiye 36 mM bulunmuştur. 33 µgm/ml sığır serum albümini veya 0,16 mM ADP katılmasıyla inhibisyon % 50'ye düşmektedir. Kinetik bulgular N-Nitrozodietilamin'in piruvat kinazı da non-

kompetatif olarak inhibe ettiğini göstermiştir. N-Nitrozodietilamin ile inkübasyondan sonra her iki enzimde diyaliz edilip, enzimlerle inhibitörün etkileşimi dalga boyuna karşı absorbans grafiği yoluyla araştırıldı. Yapılan poliakrilamit jel elektroforezi sonucu, N-Nitrozodietilamin'in glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ile bağlandığı gözlemlendi. Bundan başka N-Nitrozodietilamin metabolizması üzerinde deneysel çalışma uygulanıp, N-Nitrozodietilamin'den asetaldehit oluşma hızı hesaplandı.

SUMMARY

THE IN VITRO INTERACTION BETWEEN N-NITROSODIETHYLAMIN AND ITS STABLE METABOLITE ACETALDEHYDE AND PYRUVATE KINASE AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ENZYMES

The aim of this work is to investigate the inhibition of the yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase and rabbit muscle pyruvate kinase with N-Nitrosodiethylamin, the protective effect of bovine serum albumin and coenzymes, the binding properties of N-nitrosodiethylamine with both enzymes and the N-Nitrosodiethylamin metabolism.

In the incubation conditions during the experiments, the N-Nitrosodiethylamin concentration inhibits 50 % of glucose-6-phosphate dehydrogenase was 4.5 mM and that of acetaldehyde 26 mM. When 12 µgm/ml BSA or 0,1 mM NADP is added with the incubation medium, the N-Nitrosodiethylamin inhibition decrease by fifty percent. In addition, it has also been observed that N-Nitrosodiethylamin inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase noncompetitively. The N-Nitrosodiethylamin concentration inhibits 50 % of pyruvate kinase was found to be 0.38 mM and that of acetaldehyde 36 mM. The inhibition decreased by 50 % when 22 µgm/ml bovine serum albumin or 0.16 mM ADP was added. The kinetics

findings also showed that N-Nitrosodiethylamin inhibits the pyruvate kinase noncompetitively. Both enzymes after incubation with N-Nitrosodiethylamin were dialyzed and the interaction of the enzymes with the inhibitor was investigated by absorbance graphy against the wavelenght. As a result polyacrylamide gel electrophoresis carried out, it was observed that N-Nitrosodiethylamin bound with glucose-6-phosphate dehydrogenase. Furthermore, experimental work on the N-Nitrosodiethylamin metabolism was carried out and the rate of acetaldehyde formation from N-Nitrosodiethylamin has been calculated.

KAYNAKLAR

1. Mc Cann J., Chol E., Yamasaki E., Ames B., Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test, Prac.Nat.Acad. Sci., 72, 5135-5139, 1975.
2. Lijinsky W., Reaction of drugs with nitrous acid as a source carcinogenic nitrosamines, Can.Res., 34, 255-258, 1974.
3. Craddock U., Ansley M., Sequential changes in DNA polymerase α and β during DENA induced carcinogenesis, Biochim.Biophys.Acta, 564, 15-22, 1979.
4. Witschi H., The effects of DENA on RNA and protein synthesis in the liver and lung of Syrian Golden Hamster, Biochem.J., 136, 789-794, 1971.
5. Bassler R., Barbason H., Effects of DENA on DNA content and nucleoli in rat hepatocytes, a precancer state analysis, Mol.Physiol., 7, 79-84, 1985.
6. Rebes H., Schalze P., Jantsch B., Growth kinetics of DENA induced enzyme deficient preneoplastic liver cell populations in vivo and in vitro. Can.Res., 32, 2577-2586, 1972.

7. Adler I., A review of coordinated research effort on the comparison of test systems for the detection of mutagenic effects, sponsored by the E.E.C., Mut.Res. 74, 77-93, 1980.
8. Druckrey H., Preussman R., Ivankovic S., N nitroso compounds in organotropic and transplacental carcinogenesis, Ann.New York Acad.Sci., 163, 677-680, 1969.
9. Weisburger J., Liver cells carcinogen metabolism and mechanism of action, Ann.New York Acad.Sci., 5, 228-231, 1980.
10. Phillips J., Lake B., Minski J., Studies on the metabolism of DENA in the rat, Biochem.Soc.Trans., 3, 285-290, 1975.
11. Magee P., Metabolism of nitrosamines, microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis, Ed. by Coon M., Academic Press, Inc., 2, 1081-1092, 1979.
12. Tomiko N., Akiro T., The effect of metabolic activation with rat liver preparations on the mutagenicity of several N-nitrosamines on a streptomycin dependent of E.Coli, Mut.Res., 26, 361-366, 1974.
13. Health F., The decomposition and toxicity dialkyl nitrosamines in rats, Biochem.J., 85, 72-91, 1962.
14. Bartsch H., Malaveille C., Montensan R., In vitro metabolism and microsome mediated mutagenicity of dialkyl nitrosamines in rat, hamster and mouse tissues Can.Res., 35, 644-651, 1975.

15. Cyzgan P., Greim H., Garro A., Cooper A., Microsomal metabolim of DMN and the cytochrome P-450 dependency of its activation to a mutagen, Can.Res., 33, 2983-2986, 1973.
16. Rickart R., Appel K., Corelations between primary effects of xenobiotics on liver cells in vitro and their mutagenicty and carcinogenicity in vivo, Short term test system for detection carcinogens, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 180-189, 1980.
17. Mattei E., Delphino A., Ferrini U., Protein synthesis inhibition induced by DMN and DENA on isolated rat hepatocytes, Experienta., 35, 213-215, 1979.
18. Bayer U., In vivo induction of sister chromatid exchanges in the bone marrow of the chinese hamster, Mut.Res., 56, 305-309, 1976.
19. Sezgin İ., Atalay A., DENA'nın insan kromozomları üzerine etkileri, C.Ü.Tıp Fak.Dergisi, 7, 28-31, 1985.
20. Argus F., Comperative study of the carcinogenic activity of nitrosamines. JNCI, 27, 695-701, 1961.
21. Dennis S., Medline A., Farber E., Rapid emergence of carcinogen induced hyperplastic lesion in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis, Am.J.Pathol., 88, 597-610, 1977.

22. Susan P., Maggee P., Nitrosamine induced carcinogenesis, Biochem J. 110, 39-47, 1968.
23. Rojewsky M., Douber W., Liver carcinogenesis by DENA in the rat, Science, 152, 83-85, 1966.
24. Bryant G., Schalt R., Argus F., Ultra structural and metabolic determinants of resistance to azo dye and susceptibility to nitrosamine carcinogenesis of the Guinea Pig, Br.J.Cancer, 36, 678-691, 1977.
25. Percino C., Staffeldt E., Cames B., Characterization of histochemically detectable altered hepatocytocfoci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with DENA or benzopyrene within one day after, Can.Res., 44, 3340-3347, 1984.
26. Pitot H., Barness L., Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of DENA, Nature, 271, 456-458, 1978.
27. Smith G., Deluce C., A model of bile duct hyperplasion in the rat induced by DENA and selective cytotoxicity, Pathology. 16, 396-400, 1984.
28. Rosenberg R., Novicki D., Promating effects of nicotinamide on the development of renal tubular cell tumors in rats initated by DENA, Can.Res., 45, 809-814, 1985.
29. Argus M., Ligeti C., Induction of malignant tumors in the Guinea Pig by oral administration of DENA, JNCI, 80, 533-544, 1968.

30. Pegy E., Balog B., Formation and subsequent excision of O^6 -Ethylquanine from DNA of rat liver following administration of DENA, Can.Res., 39, 5003-5009, 1979.
31. Polframan J., Macnob J., Crosby N., An evaluation of the alkali flame ionisation detector and the coulson electrolytic conductivity detector in the analysis of N-Nitrosamines in foods, J.Chromat., 76, 307-319, 1973.
32. Spahilamani A., Chadna M., Bhidi S., Pratap A., Nair J., Detection of nitrosamines in the saliva of habitual chewers of tobacco, Food and Chem.Toxicol., 22(4), 261-264, 1984.
33. Bergmeyer H., Methods of enzymatic analysis, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Florida, Sec.Ed., 642-783, 1971.
34. Menevşe A., Menevşe S., Temel Biyokimya, Ankara İktisadi Ticari İlimler Akademisi, Ankara, 25-27, 1978.
35. Lehninger A., Biochemistry, Worth Publishers Inc., New York, Sec Ed., 405-410, 1970.
36. Pasternak C., İnsan Biyokimyasına Giriş, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 42-43, 1980.
37. Zubay G., Biochemistry, Addison-Wesley Publishing company, London, 125-126, 1983.
38. Worthington enzymes, enzyme reagent related biochemistry, Worthington biochemical corporation, New Jersey, 182-195, 1972.

- 39.Tanaka T., Horano Y., Marimura H., Crystalization characterization and metabolic regulation of two types pyruvate kinase isolated from rat tissues, J.Biochem., 62(1), 71-91, 1967.
- 40.Bonder R., Pon N., Purification of rabbit muscle pyruvate kinase by CM sephedex and evidence for an endogenous inhibitor, Biochim.Biophys.Acta, 191, 743-747, 1969.
- 41.Kılınç K., Özer N., İnsan alyuvar piruvat kinazının dietilpirokarbonat ile modifikasyonu, Biyokimya Dergisi, 7(1):17-29, 1982.
- 42.Kılınç K., Özer N., Protein derişimi ve pH nın indirgenmiş ve indirgenmemiş insan piruvat kinazının kinetik özelliklerine etkisi, Biyokimya Dergisi, 9(2), 2-17, 1984.
- 43.Bingöl G.,Biyokimya, 2.Baskı, Mis Matbaası, Ankara, 59-61, 1981.
- 44.Harper H., Fizyolojik Kimyaya Bakış, Ege Üniversitesi, İzmir, 335-336, 1976.
- 45.Engel H., Demscho W., Albert M., Protein structure and enzymatic activity, Biochim.Biophys.Acta, 191, 599-616, 1969.
- 46.Noltmann E., Gubler C., Kuby S., G6PDH, J.Biol.Chem., 236(5),1225-1230, 1961.

47. Gözükara E., G6PDH enziminin özellikleri metabolik ve klinik açıdan önemi, Biyokimya Dergisi, 2(2), 217-233, 1978.
48. Biochemica information, Boehringer Mannheim, West Germany, 99-155,
49. Pederson T., Buega J., Aust S., Microsomal electron transport, J. Biol. Chem., 248(20), 7134-7141, 1973.
50. Farrelly J., A new assay for the microsomal metabolism of nitrosamines, Can. Res., 40, 3241-3244, 1980.
51. Selim S., Separation and quantitative determination of traces of carbonyl compounds as their 2, 4 dinitrophenylhydrazones by HPLC, J. Chromat., 136, 271-277, 1977.
52. Methods of enzymatic food analysis, Boehringer Mannheim 3-4, 1984.
53. SDS and conventional polyacrilamide gel electrophoresis with LKB 2117 multiphor, LKB., Bromma, Sweden, 1977.
54. Schwert G., Winer A., LDH, Ed. by Boyer P., Lardy H., Myrback K., The Enzymes, Sec. Ed., Academic Press, Inc., New York, 12, 7, 1963.
55. Bemis J., Argus M., Arcos J., Studies on the denaturation of biological macromolecules by chemical carcinogens, Biochim. Biophys. Acta. 126, 274-285, 1966.

56. Atalay A., Nitrozolu bileşiklerin sıçan karaciğerlerindeki LDH enzimlerine in vitro etkileri, C.Ü.Tıp Fak.Dergisi, 3(3-4), 208-214, 1981.
57. Atalay A., Fare karaciğer malat dehidrogenaz enziminin DENA tarafından inhibisyonu, Biyokimya Dergisi, 10(1), 22-28, 1985.
58. Atalay A., Aker A., Maya G6PDH enziminin DENA tarafından inhibisyonu, Doğa Tıp ve Ecz.Der., 11(1), 8-12, 1987.
59. Poirier M., Poirier L., Lepage R., The hepatic activities of 1-Carbon enzymes during the chronic administration of DENA, 2-Acetylaminofluorene and N,N Dimethyl-4-aminobenzene to rats, Can.Res., 32, 1104-1107, 1972.
60. Teras L., Kildema L., Birk R., Alterations in carbohydrate metabolizing enzymes induced hormones during the process of carcinogenesis, Modulators of experimental carcinogenesis, Ed. by Turusov V., Montesani R., IARC, Lyon, 51, 285-293, 1983.
61. Giuliani E., Zaki F., Hall J., Serum and hepatic enzyme activity in rats treated with DENA, Toxicol. Pathol., 11(1), 23-27, 1983.
62. Özkurt M., Kanserojen madde verilmiş farelerin karaciğer hücrelerindeki biyokimyasal değişimler, Gazi Üni. Tıp Fak.,Biyokimya Anabilim Dalı, Bilim Uzmanlığı tezi, 1985.

63. Magour S., Nievel J., Effect of inducer of drug metabolizing enzymes on DENA metabolism and toxicity, Biochem.J., 123, 8-9, 1971.
64. Chau Í., Dagani D., Archer M., Kinetic studies on the hepatic microsomal metabolism of DENA, DMN and methylethyl nitrosamine in the rat, J.Natl.Can.Inst., 61(2), 517-520, 1978.
65. Miller A., Miller E., Metabolic activation and reactivity of chemical carcinogens, Mut.Res., 33, 25-26, 1975.
66. Miller E., Miller A., The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanism of action in carcinogenesis, Secil C.(Ed.), Chemical Carcinogens, ACS Monograph, Washington, 737-762, 1976.

ÖZGEÇMİŞİM

Denizli'de 1958 yılında doğdum. Orta öğrenimimi Ankara Kurtuluş lisesinde tamamlayarak 1975 yılında H.Ü. Kimya Fakültesi Kimyagerlik Bölümüne girdim. 1981 yılında Kimyager olarak mezun oldum. Aynı yıl C.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına Kimyager olarak atandım. 1983 yılında araştırma görevlisi kadrosuna geçtim. 1984 yılında Biyokimya Bilim Uzmanlığı derecesi aldım. 1981 yılından bu yana aynı Üniversitede araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

Evli ve iki kız annesiyim.

Sevtap BAKIR

T. G.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi